

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA
E *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA UTILIZANDO
GRUPOS FILOGENÉTICOS E A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Tese de Doutorado

Autora: Daniela Tonini da Rocha

**PORTO ALEGRE
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA
E *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA UTILIZANDO
GRUPOS FILOGENÉTICOS E A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Autora: Daniela Tonini da Rocha
Tese apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Medicina Veterinária Preventiva,
especialidade de Sanidade Avícola.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu
Pippi Salle**

PORTO ALEGRE
2018

CIP - Catalogação na Publicação

TONINI DA ROCHA, DANIELA

Caracterização de *Escherichia coli* patogênica aviária e *Escherichia coli* uropatogênica utilizando grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana / DANIELA TONINI DA ROCHA. -- 2018.

59 f.

Orientador: CARLOS TADEU PIPPI SALLE.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Escherichia coli*. 2. APEC. 3. UPEC. 4. antimicrobianos. 5. grupos filogenéticos. I. TADEU PIPPI SALLE, CARLOS, orient. II. Título.

Daniela Tonini da Rocha

CARACTERIZAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA
E *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA UTILIZANDO
GRUPOS FILOGENÉTICOS E A RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Aprovada em 02 MAR de 2018.

APROVADA POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da Comissão

Prof. Prof. Dr. Luiz César Bello Fallavena
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, que por pouco tempo que esteve presente, me ensinou os princípios da vida, modelando meu caráter e guiando meus passos. À minha família, que me incentivou a ir em busca dos meus sonhos e objetivos.

Ao Felipe, uma pessoa especial, apareceu na minha vida e eu agradeço muito por isso, seu apoio, sugestões e ensinamentos contribuíram para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle, obrigada pela confiança, pelas sugestões e por toda a atenção dispensada ao longo deste trabalho, só tenho a agradecer.

Ao colega Silvio sempre disposto a auxiliar com suas ideias, opiniões e sugestões. Obrigada por seu trabalho “Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*”, que forneceu subsídios para escrever esta tese de Doutorado.

Ao professor Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes, aos colegas Thales, Karen, Anabele e a todos que de uma maneira ou outra contribuíram na realização desse trabalho, meu muito obrigada.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa que recebi, pelo período de um ano, de Doutorado .

RESUMO

O patógeno *Escherichia coli* pertence ao grupo de cepas que podem causar infecções extraintestinais, designadas como (ExPEC). Existem cepas de *E. coli* ExPEC, tais como: a *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC), a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a *E. coli* patogênica para aves (APEC). Na avicultura, esta bactéria é responsável por vários processos patológicos, atuando tanto como agente primário como secundário, sendo responsável por significativas perdas econômicas que ocorrem na produção avícola. Vários trabalhos têm demonstrado que muitos isolados ExPEC de humanos e animais compartilham genes de virulência em comum, sugerindo que ocorra uma troca genética entre essas cepas, e o risco para a saúde humana de tais bactérias ainda é indefinido. Além disto, existe outra preocupação em relação ao fato de estudos sugerirem que a *E. coli* pode facilmente adquirir resistência a antimicrobianos utilizados por humanos e animais. As aves domésticas são reconhecidas como importante fonte de disseminação de resistência antimicrobiana às amostras de *E. coli*. O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização de amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) através da classificação em grupos filogenéticos e da avaliação da resistência antimicrobiana. Neste trabalho foram utilizados os dados disponíveis referentes a 237 cepas de *E. coli* isoladas de camas de aviários, lesões de celulite e quadros respiratórios de frangos de corte e 211 amostras de *E. coli* uropatogênica (UPEC) isoladas de pacientes com infecção urinária. Para verificar se existia diferença significativa entre a resistência antimicrobiana a (ampicilina, gentamicina, norfloxacin, amicacina e cefuroxima) e a origem das amostras, e destes mesmos antimicrobianos em relação aos grupos filogenéticos. As amostras APEC diferiram na resistência antimicrobiana das amostras UPEC para ampicilina, gentamicina, norfloxacin e cefuroxima. O mesmo não foi observado para a amicacina. Nas condições do presente trabalho, estes resultados contrariam, parcialmente, os estudos que sugerem que a resistência antimicrobiana é originária das amostras de origem avícola, já que três dos cinco fármacos testados apresentaram maior resistência nas amostras UPEC que nas APEC. Quando analisada a relação entre os grupos filogenéticos observou-se que o perfil de resistência antimicrobiana foi semelhante em todos os grupos, somente para norfloxacin e ampicilina houve diferença, porém a resistência estava bem distribuída entre os quatro grupos, comprovando que a patogenidade não se relaciona com a resistência antimicrobiana. Este fato já havia sido caracterizado em trabalho anterior da mesma autora. Estes resultados ressaltam a necessidade de realizar monitorizações rotineiras e constantes visando conhecer as flutuações da patogenidade e da resistência antimicrobiana, separadamente.

Palavras chaves: Resistência, APEC, UPEC, antimicrobianos, patogenidade.

ABSTRACT

The pathogen *Escherichia coli*, belongs to the group of strains that can cause extraintestinal infections, designated as (ExPEC). There are strains of extraintestinal *E. coli* ExPEC as: a *E. coli* that causes neonatal meningitis (NMEC), a uropathogenic *E. coli* (UPEC) and a avian pathogenic *E. coli* (APEC). In poultry, this bacterium is responsible for several pathological processes, acting as primary agent and secondary as well, and it is also responsible for significant economic losses that occur in poultry production. Several articles show that many ExPEC isolates from humans and animals share common virulence genes, suggesting a genetic exchange between these strains, and the risk to human health of more bacteria is still undefined. In addition, there is another concern about studies which suggest that

E. coli can readily acquire antimicrobial resistance when used by animals and humans. Poultry is recognized as an important source of dissemination of antimicrobial resistance in *E. coli* samples. The objective of the present study was to characterize samples of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) using phylogenetic groups and antimicrobial resistance. In this study, we used data available on 237 strains of *E. coli* isolated from avian litter, cellulitis lesions and respiratory lesions of broilers and 211 uropathogenic *E. coli* (UPEC) samples isolated from patients with urinary tract infection. To verify if there was a significant difference between the antimicrobial resistance (ampicillin, gentamicin, norfloxacin, amikacin, cefuroxime) and the origin of the samples, and of these same antimicrobials and phylogenetic groups. The APEC samples differed in antimicrobial resistance of the UPEC for ampicillin, gentamicin, norfloxacin and cefuroxime. The same was not observed for amikacin. Under the conditions of the present study, these results partially contradict the studies which suggest that antimicrobial resistance originates from samples of poultry origin, three of the five drugs tested, presented higher resistance in the UPEC samples than in the APEC. When analyzing the relationship between the phylogenetic groups, it was observed that the antimicrobial resistance profile was similar in all groups, only for norfloxacin and ampicillin there was a difference, but the resistance was well distributed among the four groups, proving that the pathogenicity was not related with antimicrobial resistance. This fact had already been characterized in previous paper by the same author. These results highlight the need to perform routine and constant monitoring in order to know the fluctuations in pathogenicity and antimicrobial resistance, separately.

Key words: Resistance, APEC, UPEC, antimicrobials, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à ampicilina nas amostras APEC e UPEC.....	33
Figura 2 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à gentamicina nas amostras APEC e UPEC.....	34
Figura 3 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à norfloxacin nas amostras APEC	35
Figura 4 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à cefuroxima nas amostras APEC e UPEC.....	36
Figura 5 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à amicacina nas amostras APEC e UPEC.	37
Figura 6 – Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à ampicilina.....	39
Figura 7 – Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à gentamicina.....	40
Figura 8 – Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à norfloxacin	41
Figura 9 – Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à amicacina.....	42
Figura 10 – Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à cefuroxima.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> , tamanho de fragmentos de amplificação e referência bibliográfica dos genes pesquisados.....	31
Tabela 2 - Determinação dos grupos filogenéticos através da identificação dos genes pesquisados.....	32
Tabela 3 - Frequência relativa (%) da classificação da resistência bacteriana ao uso do antimicrobiano ampicilina nas cepas APEC e UPEC.....	33
Tabela 4 - Frequência relativa (%) da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano gentamicina referente as cepas APEC e UPEC.....	34
Tabela 5 - Frequência relativa (%) da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano norfloxacin referente as cepas APEC e UPEC.....	35
Tabela 6 - Frequência relativa (%) da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano cefuroxima	36
Tabela 7 - Frequência relativa (%) da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano amicacina.....	37
Tabela 8 - Frequência da susceptibilidade das amostras APEC e UPEC frente aos antimicrobianos estudados e sua classificação nos grupos filogenéticos...	38
Tabela 9 - Associação dos grupos filogenéticos com à susceptibilidade antimicrobiana à ampicilina das amostras de <i>Escherichia coli</i>	39
Tabela 10 - Associação dos grupos filogenéticos com à susceptibilidade antimicrobiana à gentamicina das amostras de <i>Escherichia coli</i>	40
Tabela 11 - Associação dos grupos filogenéticos com à susceptibilidade antimicrobiana à norfloxacin das amostras de <i>Escherichia coli</i>	41
Tabela 12 - Associação dos grupos filogenéticos com à susceptibilidade antimicrobiana à amicacina das amostras de <i>Escherichia coli</i>	42
Tabela 13 - Associação dos grupos filogenéticos com à susceptibilidade antimicrobiana à cefuroxima das amostras de <i>Escherichia coli</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ADDL	Avaliação Digital de Depleção Linfocitária
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
DRC	Doença Respiratória Crônica
ECOR	Coleção de referência de <i>Escherichia coli</i>
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i> ágar
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraintestinal
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IP	Índice de Patogenicidade
PIB	Produto Interno Bruto
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
mM	Milimolar
N	Número de pintos inoculados
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite do recém-nascido
PIB	Produto Interno Bruto
pmol	Picomol
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA(s)	Redes Neurais Artificiais
UBABEF	União Brasileira da Avicultura
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UTI	Infecções do Trato Urinário
µm	Micrômetro
µL	Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
kg	Quilograma
U	Unidade
x ²	Qui – quadrado
>	Maior
<	Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	<i>Escherichia coli</i>	15
3.2	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária (APEC)	17
3.3	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica (UPEC)	18
3.4	<i>Escherichia coli</i> e a saúde pública	20
3.5	Grupos filogenéticos	21
3.6	Resistência antimicrobiana por <i>Escherichia coli</i>	23
3.7	Estudos desenvolvidos no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária	25
4	ESTRUTURA DA TESE	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	Amostras	29
5.2	Teste de sensibilidade antimicrobiana	29
5.3	Grupos filogenéticos	30
5.3.1	Extração do DNA e classificação das cepas em grupos filogenéticos	31
5.4	Análise estatística	32
6	RESULTADOS	33
6.1.1	Ampicilina	33
6.1.2	Gentamicina	34
6.1.3	Norfloxacina	35
6.1.4	Cefuroxima	36
6.1.5	Amicacina	37
6.2	Grupos filogenéticos e resistência antimicrobiana	38
6.2.1	Ampicilina	39
6.2.1	Gentamicina:	40
6.2.1	Norfloxacina:	41
6.2.3	Amicacina	42
6.2.3	Cefuroxima	43
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXO 1	57
	ARTIGOS RELACIONADOS	58

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira tem se destacado pela extensão territorial do país, clima, tecnologia, mão-de-obra, autossuficiência em grãos e logística de transporte, refletindo em altos índices produtivos, o que torna o Brasil atualmente o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango. Juntamente, a qualidade, imagem de produto saudável e preços acessíveis também auxiliaram na conquista dessa posição (ABPA, 2017).

A importância social da avicultura no Brasil também é relevante, pois esta atividade emprega mais de 3,6 milhões de pessoas de forma direta e indiretamente, e responde a quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (ABPA, 2015). O crescimento observado em 2011 foi impulsionado principalmente pelo aumento no consumo de carne de frango e pela expansão nas exportações. Sendo que, a produção de carne de frango em 2011 foi superior a 13 milhões de toneladas, com um crescimento de 6,8% em relação a 2010. (UBABEF, 2012).

Apesar da retração econômica causar um impacto negativo nos níveis de consumo de proteína animal no Brasil que foi de 41,10 Kg/habitante/ano em 2016, a carne de frango e os ovos se consolidam como alternativas acessíveis ao consumidor, pois são as fontes de proteína animal mais baratas que existem no país (ABPA, 2017).

Para a manutenção destes altos índices produtivos, se faz necessária a monitorização da saúde dos plantéis avícolas. Nos atuais modelos de produção, têm-se observado o aumento da ocorrência de várias doenças que prejudicam a qualidade final do produto. Neste cenário, *Escherichia coli* (*E. coli*), que foi por muito tempo esquecida como potencial patógeno, destaca-se devido aos prejuízos econômicos que gera, seja pela condenação total e/ou parcial de carcaças como em gastos com medicamentos.

A bactéria *Escherichia coli* é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, pericardite, peri-hepatite, peritonite, salpingite, onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, celulite, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006). O grupo das cepas de *E. coli* que causam infecções extraintestinais são designadas como ExPEC (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Pertencem a esse grupo de *E. coli* extraintestinal (ExPEC): a *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e a *E. coli* patogênica para aves (APEC) (CUNHA *et al.*, 2015).

Muitos isolados ExPEC de humanos e animais compartilham genes de virulência em comum, o que acaba sugerindo que ocorra uma troca genética entre essas cepas, e o risco para

a saúde humana de tais bactérias ainda é indefinido (GREGERSEN *et al.*, 2010; LYNNE *et al.*, 2012).

Estudos têm sugerido que a *E. coli* pode facilmente adquirir resistência contra antimicrobianos utilizados por humanos e animais. Sendo que, as aves domésticas são reconhecidas como importante fonte de disseminação de resistência antimicrobiana a amostras de *E. coli*. O uso indiscriminado de antimicrobianos carregam com eles o risco de selecionar organismos resistentes, perdendo a eficácia do medicamento sobre o microrganismo em futuras infecções (HUSSAIN *et al.*, 2017)

Vários trabalhos já foram realizados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), quando o assunto é relacionado a *Escherichia coli*. Estes trabalhos sob forma de dissertações de mestrado, teses de doutorado contribuíram para a formação de um valioso banco de dados sobre este tema. Distintas análises já foram realizadas utilizando essas informações, inicialmente foi identificado o índice de patogenicidade das amostras APEC (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016), posteriormente foram identificados genes de virulência destas mesmas amostras, trabalhou-se também com o comportamento bioquímico e a resistência antimicrobiana. Também foram desenvolvidos trabalhos para avaliar a produção de biofilme e a ação de desinfetantes sobre as amostras APEC formadoras de biofilme, além, da classificação destas amostras nos seus respectivos grupos filogenéticos.

Através de uma parceria entre o CDPA e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e vislumbrando possíveis questionamentos sobre o fato da *E. coli* ser considerada uma bactéria com potencial zoonótico, foi desenvolvido um estudo com amostras de *E. coli* uropatogênicas. Inicialmente foi realizada a identificação de 38 genes de virulência, posteriormente a classificação destas amostras nos seus respectivos grupos filogenéticos e a associação com a patogenicidade *in vivo*.

Seguindo a linha de pesquisa desenvolvida no CDPA, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização de amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) utilizando grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar as similitudes e diferenças, quanto à resistência antimicrobiana e aos grupos filogenéticos, amostras de *Escherichia coli* de origem aviária (APEC) e humana (UPEC).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de resistência antimicrobiana em relação a cinco antibióticos de uso comum, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, em amostras APEC e UPEC.
- Estabelecer a relação entre grupos filogenéticos e a sensibilidade/resistência antimicrobiana de amostras APEC e UPEC.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor von Escherich, sendo chamada de *Bacterium coli commune*. Inicialmente foi identificada como parte da microbiota entérica da maioria dos animais e foi considerada durante muito tempo um microrganismo não patogênico. No entanto, após alguns sorotipos de *E. coli* serem associados a doenças em animais e seres humanos, esta caracterização foi modificada (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Aproximadamente 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extra-intestinais (ExPEC) (ROCHA *et al.*, 2017 *apud* JOHNSON J.R. & RUSSO, T.A, 2005).

A *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo um bastonete Gram-negativo, não esporulado, podendo ser móvel ou imóvel, com aproximadamente 0,5 µm de diâmetro e 1 a 3 µm de comprimento. (MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.M., 2016). Esta bactéria é de fácil cultivo laboratorial, não exigindo meios de cultura diferenciados ou condições especiais e o seu crescimento ocorre em temperaturas entre 18°C a 44°C. Em ágar *Mac Conkey* as colônias se apresentam na cor rosa clara circundadas por um precipitado, e em ágar *Eosyn – Methylene – Blue* (EMB), são verde escuras com tom metálico ou pretas (BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J.P., 2008; ANDREATTI FILHO, 2006; BACK, 2010) .

Com relação às *E. coli* patogênicas extra-intestinais, sua denominação mais frequentemente reflete o sítio de isolamento e não as características que definiriam um patotipo, como os marcadores de virulência que possuem. Desta forma, as amostras isoladas de infecção urinária são conhecidas como UPEC (*E. coli* uropatogênica), e as isoladas de meningites como MNEC (*E. coli* associadas à meningite neonatal). Ainda, as amostras isoladas de colibacilose aviária são denominadas APEC (*E. coli* patogênica aviária) (SANTOS *et al.*, 2009). A bactéria *E. coli* uropatogênica (UPEC) é responsável pela maioria das infecções do trato urinário, consequência de uma base genética que permite a colonização e a sobrevivência em nichos específicos do hospedeiro, bem como à disponibilidade de um arsenal de fatores de virulência (REU, C.E, 2013).

As amostras de *E. coli* possuem diversos determinantes antigênicos localizados principalmente na parede celular, como antígenos somáticos (O), antígenos flagelares (H), antígenos capsulares (K) e fímbrias (P), os quais são usados para sorotipagem de *E. coli*. O

método de sorotipagem mais frequentemente empregado baseia-se na pesquisa dos antígenos O (somático) e H (flagelar) (CUNHA *et al.*, 2013).

Os antígenos somáticos correspondem a uma das frações do maior componente da parede celular das bactérias Gram negativas, o lipopolissacárideo (LPS). A especificidade desses antígenos é determinada pelas cadeias laterais de carboidratos. Os antígenos flagelares são de natureza protéica, não são utilizados com frequência na identificação antigênica das amostras de *E. coli*. A presença de flagelo não tem sido correlacionada com a patogenicidade, e os antígenos capsulares são compostos de polissacarídeos. Antígenos proteináceos fimbriais agem como adesinas, facilitando a aderência a superfícies mucosas (QUINN *et al.*, 2005; FERREIRA & KNÖBL, 2009; CUNHA *et al.*, 2013).

Muitos pesquisadores em todo o mundo têm procurado determinar quais os sorogrupos de *E. coli* são causadores de patologias em frangos. Os principais sorogrupos relacionados com a colibacilose aviária são O1:K1, O2:K2, O36 e O78:K80, embora outros sorogrupos como o O4, O6, O11, O21, O50, O88, O 119 possam ser isolados. No Brasil, os sorogrupos mais prevalentes são: O2, O21, O36, O50, O78, O88, O119, O152. No entanto, muitas amostras patogênicas não pertencem a nenhum destes grupos “O”, sendo caracterizadas como não tipificáveis sorologicamente (GROSS, 1994; FERREIRA & KNÖBL, 2009). Embora a sorologia seja um método simples de associação epidemiológica com a ocorrência de colibacilose, a técnica não é suficiente para a caracterização de cepas patogênicas de *E. coli*, devido à prevalência de cepas não tipáveis, sendo necessário o emprego de técnicas moleculares para a identificação de genes de virulência bacteriana (CUNHA *et al.*, 2013). Porém, como a presença de genes de virulência em uma determinada amostra não determina obrigatoriamente expressão deste gene, Souza e colaboradores (2016) desenvolveram um estudo no qual estabeleceram um índice de patogenicidade *in vivo*, para amostras APEC.

Ainda em relação à determinação da patogenicidade de amostras de *E. coli* APEC, trabalhos utilizando análises filogenéticas têm demonstrado que as cepas de *E. coli* são classificadas em quatro grupos principais (A, B1, B2 e D). Assim, as amostras comensais, em sua grande maioria, são agrupadas nos grupos filogenéticos A e B1, já as amostras patogênicas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo B2 e, em menor grau, ao grupo D (CLERMONT, BONACORSI & BINGEN, 2000; ROCHA *et al.*, 2017).

Embora a transferência horizontal de genes possa converter cepas comensais em potenciais patógenos, a seleção de fatores de virulência que tem dirigido este processo ainda não foi elucidado. Estudos indicam que a maioria das cepas ExPEC evoluiu de uma cepa

ancestral com acúmulo de genes de virulência recebidos por transferência horizontal (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

3.2 *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC)

A bactéria *Escherichia coli* é responsável por vários processos patológicos nas aves, atuando como agente primário ou secundário na aerossaculite, pericardite, peri-hepatite, peritonite, salpingite, onfalite, sinovite, coligranuloma, síndrome da cabeça inchada, celulite, entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006). O termo colibacilose é empregado para estas infecções localizadas ou sistêmicas, as quais são causadas total ou parcialmente pela *E. coli* potencialmente patogênica para aves (APEC) (BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J.P., 2008). A bactéria *Escherichia coli* patogênica aviária também contribui significativamente para o aumento da mortalidade na primeira semana de galinhas, perus e outras aves (GREGERSEN *et al.*, 2010).

O trato intestinal das aves é normalmente colonizado por esta bactéria, podendo ser encontrada em uma concentração de 10^6 unidades formadoras de colônias (UFCs) por grama de fezes, sendo que aproximadamente 10 a 20% dos coliformes fecais são representados por sorotipos de *E. coli* potencialmente patogênicos. Há uma excreção contínua de *E. coli* portadora de fatores de virulência pelas fezes, o que torna a sua distribuição cosmopolita (FERREIRA & KNÖBL, 2009; BACK, 2010).

O aparecimento da colibacilose é o resultado da interação da bactéria com o hospedeiro e com o meio ambiente. A *E. coli* torna-se clinicamente aparente quando fatores ambientais adversos estão presentes, como a amônia, umidade da cama, poeira, variação climática, alta densidade, além da presença de outros agentes patogênicos, tais como os pertencentes ao gênero *Mycoplasma*, o vírus da bronquite infecciosa, o vírus da doença de Newcastle entre outros (ANDREATTI FILHO, 2006; BACK, 2010). Desta maneira, qualquer fator ambiental, nutricional ou infeccioso que possa lesar o epitélio respiratório, assim como aqueles que interfiram com o sistema imunológico podem tornar a ave susceptível à infecção por amostras de *E. coli* patogênicas (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Entre as doenças causadas pela APEC, destaca-se a doença respiratória crônica (DRC), processo de grande importância em frangos de corte em razão das perdas econômicas decorrentes da mortalidade e de condenações no abatedouro. Neste caso, a porta de entrada da bactéria mais frequente é o trato respiratório superior, ocorrendo a multiplicação do agente na

traqueia com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes (ANDREATTI FILHO, 2006; FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Outra doença de relevância associada à infecção por *E. coli* que acomete frangos de corte, resultando em um grande número de condenações no abatedouro devido ao aspecto repugnante da carcaça é a celulite (FERREIRA & KNÖBL, 2009). A celulite é uma reação inflamatória difusa que resulta de infecção subcutânea, caracterizada pela presença de exsudato, espessamento de pele e placas fibrinocaseosas (ANDREATTI FILHO, 2006). Ela localiza-se principalmente nas regiões de abdômen e sobrecoxa, podendo estar presente também na cabeça, pescoço, coxa, dorso, asas, peito e região cervical, sendo frequentemente unilateral (VIEIRA *et al.*, 2006). Esta é uma doença de etiologia multifatorial, pois são necessários, pelo menos, dois fatores para a sua ocorrência. A necessidade de um trauma qualquer que resulte em ferimento na pele e a presença maciça de contaminação por *E. coli* são fatores que condicionam o aparecimento da celulite (NORTON; BILIGILI & MCMURTREY, 1997).

Este verdadeiro complexo de processos patológicos que caracteriza a colibacilose faz com que esta doença tenha relevância no cenário da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos. Estes incluem as perdas ocasionadas por condenações de carcaças, além do aumento de mortalidade embrionária, do menor desenvolvimento corpóreo da ave, do aumento do índice de conversão alimentar, aumento da mortalidade, além dos gastos com medicamentos (ROCHA, 2015 *apud* ANDREATTI FILHO, 2006; KABIR, 2010; WANG *et al.*, 2010).

A utilização de vacinas é uma estratégia capaz de reduzir os prejuízos econômicos em aves adultas, mas apresenta algumas limitações. Embora a vacina possa reduzir momentaneamente os prejuízos econômicos, dificilmente fornecerá uma proteção de longo prazo contra todos os sorotipos circulantes. Além do uso comercial de vacinas vivas também ser um tópico bastante polêmico, principalmente em função da preocupação com a segurança do agente. Esta preocupação é crescente devido às semelhanças genéticas entre APEC e outras ExPEC (CUNHA *et al.*, 2013).

3.3 *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC)

A infecção do trato urinário, também conhecidas pela sigla UTI (*urinary tract infections*), pode ser definida como a presença de microrganismos que se fixam e se multiplicam nas vias urinárias, podendo atingir a uretra causando (uretrite), a bexiga (cistite),

os rins (pielonefrite) e os ureteres. As UTIs estão entre as infecções mais frequentes em todo o mundo e têm como principal agente etiológico a *E. coli* uropatogênica (UPEC), responsável por cerca de 80% a 90% dos casos de infecções do trato urinário (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

Aproximadamente 150 milhões de pessoas, ao redor do mundo, desenvolvem infecções do trato urinário anualmente. É estimado que 40% a 50% das mulheres desenvolvam problemas de infecções do trato urinário pelo menos uma vez na vida, e destas, 11% com idade acima de 18 anos tem um episódio pelo menos uma vez no ano (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

Sabe-se também que a uretra feminina tem menos de 5cm de comprimento. Ela é mais próxima do ânus e de seus contaminantes intestinais que a uretra masculina. Isso reflete no fato de que a taxa de infecção do sistema urinário em mulheres é cerca de oito vezes maior que em homens. Entretanto, pacientes cateterizados, idosos e crianças também são bastante afetados por esta patologia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; EUSÉBIO *et al.*, 2016).

As infecções do trato urinário são, em geral, causadas por bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas presentes na microbiota intestinal. A *E. coli* uropatogênica (UPEC) é o patógeno mais frequentemente correlacionado com problemas urinários, sendo isolado como agente infeccioso em mais de 80% das infecções do trato urinário e em casos de pielonefrite (SARKAR *et al.*, 2014).

A *E. coli* UPEC têm origem intestinal, embora não façam parte das *E. coli* comensais. A partir dos intestinos, elas podem migrar e colonizar as regiões periuretrais. Oportunamente, entram na uretra, sobem para a bexiga e se aderem ao epitélio vesical através das fímbrias tipo 1 e P. A partir da bexiga, a bactéria pode chegar aos ureteres e, posteriormente, aos rins onde sua adesão ocorre principalmente através da fímbria P (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008; DALE & WOODFORD, 2015).

A adesina *fimH*, representativa das fímbrias do tipo 1, liga-se especificamente à uroplaquina Ia, uma glicoproteína expressa pelas células vesicais importante na formação de biofilme. A adesão mediada pela fímbria do tipo 1 é importante durante os estágios iniciais de colonização. A motilidade e quimiotaxia do flagelo bacteriano permitem que a *E. coli* UPEC dissemine-se para novos sítios do trato urinário. Já as fímbrias do tipo P ou *Pyelonephritis associated pili* (Pap) estão associadas à pielonefrite aguda não complicada, sendo essenciais para a colonização do trato urinário superior (TIBA; NOGUEIRA; LEITE, 2009; EUSÉBIO *et al.*, 2016).

Em um estudo realizado com 140 amostras UPEC isoladas de pacientes com infecção do trato urinário, no qual pesquisaram grupos filogenéticos, ilhas de patogenicidade e genes de virulência, observou-se que o gene de virulência *fimH* esteve presente em 85% das amostras, seguido de *iucC* (61,4%) e as adesinas: *pap C* (38,6%), *afa* (10,7%), *pap G* (9,3%) e *sfa/foc* (0,7%); toxinas: *hlyA* (22,1%), *cnf-1* (18,6%); e invasina: *ibeA* (3,6%) (NAJAFI, *et al.*, 2017).

Os genes que codificam estes fatores de virulência podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos, e podem também estar associados a elementos genéticos móveis, como as ilhas de patogenicidade. Das 8 ilhas de patogenicidade já conhecidas em *E. coli* destacam-se a I_{CFT073} e a PAI_{IICFT073}. A primeira possui um grupo de genes que codificam para a α -hemolisina e a Pap, enquanto a segunda transporta genes codificadores da Pap (EUSÉBIO *et al.*, 2016). A expressão destes fatores de virulência desempenha um papel importante nas infecções do trato urinário, permitindo as cepas UPEC colonizar e invadir as células, evadir os mecanismos de defesa, lesionar os tecidos e estimular uma resposta inflamatória nociva do hospedeiro (NAJAFI, *et al.*, 2017; ROCHA, 2017)

3.4 *Escherichia coli* e a saúde pública

Com base em relatórios anamnésicos clínicos e de características de virulência realizados por médicos e veterinários, as informações sobre as *E. coli* que causam infecções frequentes em homens e animais têm aumentado consideravelmente ao longo dos anos. Os isolados de *E. coli* provenientes de animais e humanos apresentam uma grande diversidade de patótipos, com muitos genes em comum, o que sugere a possibilidade de trocas genéticas entre eles e, conseqüentemente, a probabilidade do surgimento de patógenos emergentes e um potencial zoonótico (BERGERON *et al.*, 2012).

Nesse contexto, várias pesquisas tratam sobre o potencial de virulência da bactéria *E. coli* em amostras APEC, em amostras UPEC e em *E. coli* que causam meningite em recém-nascidos (NMEC), sugerindo uma sobreposição como um potencial zoonótico (EWERS *et al.*, 2007). Cepas de *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) são a causa da maioria das infecções hospitalares, incluindo as do trato urinário, corrente sanguínea e meningite neonatal. Durante os últimos 10 anos tem crescido o reconhecimento de que certas linhagens de *E. coli* ou grupos clonais são responsáveis por uma grande fração de infecções humanas por *E. coli* extra-intestinais e que estas linhagens desenvolvem resistência antimicrobiana (JOHNSON *et al.*, 2012).

Estudos moleculares e epidemiológicos de ExPEC em todo o mundo identificaram vários potenciais reservatórios para ExPEC, incluindo o trato intestinal humano, além de vários reservatórios não-humanos, tais como alimentos animais e dos produtos à base de carne. Além disto, outras fontes ambientais, bem como animais de companhia podem ter implicações e importância em saúde pública (JAKOBSEN *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2009; MITCHELL *et al.*, 2015).

Pesquisas documentaram a presença de ExPEC no intestino de aves saudáveis e na carne destes animais, sendo que algumas destas cepas são geneticamente semelhantes às responsáveis por infecções humanas. Com base na análise epidemiológica e molecular, suspeita-se que os animais, principalmente as aves, sejam fonte de bactérias capazes de causar infecções ExPEC humanas. No entanto, a frequência com que o seres humanos adquirem ExPEC através do consumo ou manuseio de alimentos contaminados com essa bactéria, e como posteriormente ocorre a infecção, ainda é indefinida (MARKLAND *et al.*, 2015; STROMBERG *et al.*, 2017)

A comparação de amostras de *E. coli* patogênica para aves e infecções extra-intestinais humanas, demonstrou que algumas dessas cepas apresentam perfis de virulência muito próximos, não podendo ser distinguidas filogeneticamente e em ensaios experimentais *in vivo*, sugerindo uma origem ancestral comum e uma capacidade de cepas potencialmente patogênicas em comprometer a saúde humana (CUNHA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2017). Porém, uma compreensão mais completa do risco zoonótico de ExPEC é necessária para desenvolver tratamentos e medidas preventivas contra infecções e contaminação de alimentos.

3.5 Grupos Filogenéticos

Os estudos sobre grupos filogenéticos iniciaram em 1984, com os pesquisadores Ochman e Selander. Eles selecionaram 72 cepas de uma coleção de referência (ECOR) de origem humana e de outros animais, e através da técnica *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) separaram os isolados em cinco grupos filogenéticos, denominados (A, B1, B2, D e E). Com base nestes resultados, Clermont e colaboradores (2000) desenvolveram um método mais simples, baseado em PCR (Triplex PCR). Esta metodologia mostrou-se mais rápida que a utilizada em estudos anteriores (MLEE), mais simples e barata, desta forma, permitindo que os isolados fossem classificados dentro de quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) (DALE & WOODFORD, 2015).

Esse método é baseado na presença ou ausência dos seguintes genes: *chuA* (responsável pelo transporte do grupo heme no sistema de aquisição de ferro de EHEC O157:H7), *yjaA* (envolvido na resposta da *E. coli* ao estresse causado por peróxido de hidrogênio, cádmio e ácidos) e um fragmento de DNA denominado TspE4.C2. O grupo A é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e do fragmento TspE4.C2. O grupo B1 é caracterizado pela ausência do gene *chuA* e pela presença do fragmento TSE4.C2. O grupo B2 é caracterizado pela presença dos genes *chuA* e *yjaA*. O grupo D, por sua vez, é caracterizado pela presença do gene *chuA* e ausência de *yjaA* (CLERMONT; BONACORSI; BIGEN, 2000).

Assim, as cepas patogênicas extra-intestinais pertencem principalmente ao grupo filogenético B2, porém, algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais, em sua grande maioria, pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000; KÖHLER & DOBRINDT, 2011)

Em um estudo realizado analisando amostras de *E. coli* uropatogênicas e *E. coli* comensais, observou-se que, das 100 amostras UPEC classificadas em relação ao seu grupo filogenético, a maioria (67%) pertenceu ao grupo filogenético B2, seguido pelo grupo D (17%), grupo A (11%) e B1 (5%). Já as amostras de *E. coli* comensais pertenceram em sua maioria ao grupo B1 (34%), seguido pelo grupo D (28%), e o grupo A (20%). O grupo B2 foi o menos frequente (18%) (SABATÉ *et al.*, 2006).

Pesquisas recentes têm classificado *E. coli* em oito grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F), e em um grupo ainda em estudo, denominado Clade I. Para este trabalho foi utilizado um quadruplex PCR, onde os grupos filogenéticos foram classificados de acordo com a presença ou ausência dos seguintes genes: *chuA*, *yjaa*, TspE4.C2 e *arpA* (CLERMONT *et al.*, 2013; DALE & WOODFORD, 2015)

Nesta nova metodologia, os autores optaram por modificar as sequências dos *primers* utilizadas no trabalho anterior (*chuA*, *yjaa*, TspE4.C2) para evitar os polimorfismos na sequência de nucleotídeos utilizados para hibridação do iniciador, e também adicionaram o gene *arpA*, caracterizando assim um quadruplex – PCR.

O gene *arpA* possui duas funções. A primeira servir como controle interno da qualidade do DNA. Em segundo lugar, a inclusão do gene *arpA* permite as cepas pertencentes ao grupo filogenético F, anteriormente identificadas de forma equivocada como grupo D, serem classificadas de forma correta, pois o gene *arpA* está presente em praticamente todas as amostras *E. coli*, com exceção das cepas pertencentes aos grupos B2 e F (CLERMONT *et al.*, 2013). Apesar dos avanços propostos por Clermont e colaboradores (2013), um pequeno

grupo de isolados ainda não pode ser classificado corretamente. Possivelmente por serem grupos filogenéticos raros ou serem o resultado de recombinação gênica (TOUCHON *et al.*, 2009; ROCHA, 2017). A análise filogenética pode ser empregada em laboratórios de diagnóstico veterinário como um *screening* para isolados de *E. coli*, incluindo a possibilidade de classificação de possíveis cepas virulentas e para levantamentos epidemiológicos (GIARDINI *et al.*, 2012).

3.6 Resistência antimicrobiana por *Escherichia coli*

A resistência aos fármacos antimicrobianos consiste na capacidade adquirida pelo microrganismo de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico, ao qual ele é normalmente susceptível. Estudos recentes têm detectado um aumento considerável na proporção de microrganismos resistentes a um ou mais antimicrobianos, mostrando que nos últimos anos o problema vem se agravando com maior rapidez, em comparação ao ocorrido em décadas anteriores (NETO; SPINOSA; GÓRNIK, 2005; MCVEY, S; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.M., 2016).

O uso indiscriminado e não medicinal dos antibióticos também contribuiu para o surgimento de linhagens resistentes. Em escala mundial, cerca de 50% de todos os antibióticos produzidos são utilizados com finalidades agropecuárias (MADIGAN, *et al.*, 2010). Em 2006, a União Européia limitou esses tipos de drogas quanto ao uso profilático e terapêutico (MENDONÇA *et al.*, 2016).

Segundo Gyles (2008), a resistência mundial aos antimicrobianos pode ser constatada em dezenas de amostras de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* e *E. coli*. O mesmo autor conclui que a evolução das populações bacterianas tem uma relação direta com o aumento da resistência às drogas antimicrobianas, e esse processo de transmissão de resistência com o passar tempo torna-se mais complexo.

No que se refere especificamente a *E. coli* comensais de animais, já é sabido que são resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como as tetraciclina, ampicilina e estreptomicina (KANG *et al.*, 2005). A possibilidade de que antimicrobianos usados na avicultura selecionem bactérias resistentes e que possam comprometer a terapêutica de doenças infecciosas aviárias é um aspecto de extrema relevância a ser considerado. Nesse contexto, microrganismos que adquiriram resistência, presentes no trato gastrointestinal das aves, poderiam contaminar alimentos provenientes

desses animais representando, dessa forma, um risco à saúde dos consumidores (NETO;SPINOSA;GÓRNIAC, 2005).

Em experimento realizado por Costa *et al.* (2008), demonstrou que a sequência de medicação utilizada em 16 mil frangos de corte, com diferentes antimicrobianos durante um curto período de tempo com objetivos profiláticos, foi acompanhado de um aumento na taxa de resistência aos antimicrobianos e da diversidade fenotípica das amostras de *E. coli*.

Atualmente, a resistência por *E. coli* a, pelo menos, duas classes de agentes antimicrobianos é comum, tanto na medicina humana quanto na veterinária, o que tem causado um crescente impacto no que seriam opções terapêuticas viáveis (BAUM & MARRE, 2005). Na verdade, devido a falhas no uso apropriado de antibióticos e no monitoramento de resistência, praticamente todos os microrganismos patogênicos desenvolveram resistência a alguns agentes quimioterápicos, desde que estes passaram a ser amplamente utilizados nos anos 1950 (MADIGAN, *et al.*, 2010).

O mundo desenvolvido também contribui para o aumento da resistência aos antibióticos. Estima-se que nos Estados Unidos 30% das prescrições de antibióticos para infecções de ouvido, 100% das prescrições para resfriado comum e 50% das prescrições para dores de garganta são desnecessárias. Além disto, metade dos antibióticos produzidos nos Estados Unidos são usados para estimular o crescimento animal, uma prática que muitos acreditam que deveria ser reduzida (TORTORA; FUNKE & CASE, 2005).

A resistência aos antimicrobianos pode ser classificada como constitutiva ou adquirida. Na resistência constitutiva os microrganismos podem ser resistentes a alguns antibióticos por não apresentarem os mecanismos celulares necessários para a suscetibilidade ao antibiótico, por exemplo, a *E. coli* é resistente à penicilina G basicamente porque o medicamento não consegue penetrar na célula. Já a resistência geneticamente adquirida pode surgir como resultado de mutações ou, de modo mais importante, por meio de transferência genética horizontal (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016). A presença de plasmídios, contendo genes de resistência a antimicrobianos em amostras de origem aviária, patogênicas ou não, indicam a possibilidade de transferência gênica lateral entre diferentes tipos de linhagens facilitando também a transferência de genes de virulência (BARROS *et al.*, 2012).

Um trabalho realizado com isolados de *Escherichia coli* a partir de fezes de frango e urina de pacientes hospitalizados mostrou alta resistência frente a 11 antimicrobianos testados. Enquanto a resistência às tetraciclinas em frangos foi de 82,4% somente 43,8% das amostras humanas foram resistentes ao mesmo antimicrobiano. Apesar da diferença de resistência nos testes de sensibilidade serem comuns às duas fontes, os genes pesquisados que

codificam tal resistência às tetraciclinas foram similares. Tais resultados sugerem que esses genes estão disseminados no meio ambiente, necessitando maior investigação acerca de fontes aviárias como possíveis agentes causadores da resistência de tetraciclinas a humanos (MILES, MCLAUHLIN & BROWN, 2006). Outro trabalho realizado por Salle (2009) pesquisou a resistência antimicrobiana de 246 amostras de *Escherichia coli* provenientes de cama de aviário, lesões de celulite e de lesões respiratórias de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos. Os dados demonstraram que todas as amostras foram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de duas das 14 drogas utilizadas.

Em um estudo desenvolvido por KOGA *et al.* (2015), em que foram analisadas 205 amostras de *E.coli* APEC coletadas no ano de 2007 ou em 2013 (121 isolados), observou-se que dos 15 antimicrobianos testados, tanto as amostras coletadas em 2007 como em 2013, apresentaram uma elevada resistência à tetraciclina. Das amostras analisadas pertencentes a 2007, 73,8% foram resistentes a 3 ou mais antimicrobianos. Já em relação as amostras coletadas em 2013, foi observado que 79,3% das cepas foram resistentes a 3 ou mais antimicrobianos e todas as amostras foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado.

3.7 Estudos desenvolvidos no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA)

Dentre os vários componentes que caracterizam a avicultura, atualmente um recebe destaque especial, a sanidade. O mundo descobriu que a garantia sanitária é fundamental para preservar tanto a saúde pública como a dos plantéis. Sendo assim, percebeu-se que o diagnóstico correto, clínico e laboratorial, juntamente com as monitorizações sanitárias são de extrema relevância. Pensando nisso, surgem uma série de trabalhos que tem como principal objetivo criar critérios que devem servir como suporte à decisão relacionada à manutenção ou às modificações nos programas sanitários, utilizando para isso, muitas vezes, as informações que já são coletadas e armazenadas pelas empresas avícolas no seu arquivo “morto”.

Há alguns anos são desenvolvidos trabalhos no CDPA nos quais utiliza-se uma ferramenta moderna chamada inteligência artificial, especificamente redes neurais artificiais, para explicar, simular e prever os resultados nos distintos segmentos da avicultura. No início os estudos tiveram como destaque as aves reprodutoras (SALLE *et al.*, 2001; SALLE *et al.*, 2003), posteriormente, seguiram outras pesquisas na produção de frango de corte (REALI, 2004), no incubatório (SALLE, 2005) e no abatedouro (PINTO, 2006). Seguindo esta linha de

pesquisa, foi realizado um estudo no qual todos os setores da avicultura foram analisados simultaneamente (SPOHR, 2011), demonstrando que é possível prever com confiabilidade muitas variáveis relacionadas com a produção avícola, como eclosão, peso do pintinho, mortalidade, condenações, entre outros.

Além dos estudos citados, o CDPA também vem trabalhando com pesquisas direcionadas para a questão sanitária dos planteis. Dentre as diversas pesquisas realizadas, pode-se destacar a criação de modelos matemáticos que tem como objetivo conhecer o estado imunológico das aves, principalmente as reprodutoras, frente aos agentes infecciosos responsáveis pelas doenças mais comuns que acometem estes animais (SALLE *et al.*, 2009). A monitorização e construção de modelos matemáticos que reflitam o status imunológico contra a doença de Gumboro (MORAES *et al.*, 2005; CAMILOTTI *et al.*, 2016). E a utilização de equações matemáticas como suporte à decisão, quando se trata de utilizar ou não adsorventes na ração para diminuir perdas por aflatoxinas (SALLE *et al.*, 1998).

Também merece destaque o desenvolvimento do sistema ADDL (Avaliação Digital de Depleção Linfocitária), uma ferramenta de análise da depleção linfocitária da bursa de fabricius, desenvolvida pelo CDPA, que permite o estabelecimento de escores de lesão através da análise digital e de redes neurais artificiais (Moraes *et al.*, 2010). Posteriormente, Salle e colaboradores (2014) e Carvalho e colaboradores (2016) compararam os escores de depleção da bursa de fabricius e do timo estabelecidos por histopatologistas e os escores estabelecidos pelo sistema ADDL.

Sabendo da importância da *E. coli* em relação à sanidade avícola, sendo sua presença tão frequente que, ao serem citadas nos laudos laboratoriais, os médicos veterinários têm dificuldades em avaliar o risco que representam. O CDPA também preocupado em auxiliar, desenvolveu diversos estudos, dissertações de mestrado e teses de doutorado abordando esse tema. Tendo em vista que a simples presença ou ausência de genes de virulência em uma amostra tanto de *E. coli* patogênica aviária, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* ou *Pasteurella multocida* não caracterizam garantia de patogenicidade, pois a presença dos genes não significam sua expressão, foi desenvolvida uma metodologia destinada a medir essa patogenicidade em uma escala de 1 a 10. Para isto foram utilizados pintos de um dia de idade observados por sete dias e formulado um fator de bonificação conforme o tempo de sobrevivência (SOUZA *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016; PILATTI *et al.*, 2016).

Seguindo essa linha de pesquisa, realizaram-se trabalhos utilizando como metodologia a caracterização dos grupos filogenéticos para *E. coli* patogênica aviária e de *PCR-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) para *P. multocida*. Essas novas ferramentas

moleculares têm como o objetivo determinar a patogenicidade sem a necessidade de inocular animais e, desta forma, implantar o monitoramento das flutuações de patogenicidade bacteriana (FURIAN *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2017).

Além da preocupação que os médicos veterinários têm em relação a bactéria ser ou não patogênica, outra pergunta relevante é relacionada com as opções de tratamento. E neste contexto surge a dúvida: “Se a bactéria é patogênica, então como eu realizo o tratamento?”. Pensando nisso, Salle (2009), em sua tese de doutorado, pesquisou a resistência antimicrobiana de 246 amostras de *E. coli* provenientes de cama de aviário, lesões de celulite e de lesões respiratórias de frangos de corte frente a 14 antimicrobianos, e observou que todas as amostras foram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de 2 das 14 drogas utilizadas.

Ainda em relação a este assunto, Rocha *et al.* (2015) utilizaram a caracterização de 38 genes responsáveis por distintos fatores de virulência oriundos das amostras de *E. coli* isoladas de frangos de corte, através das redes neurais artificiais (RNAs), para prever a sensibilidade e resistência bacteriana. Neste trabalho, observou-se que a caracterização dos 38 genes associados a virulência torna-se um empecilho, devido ao trabalho e tempo necessário para realizar esta técnica molecular, o que dificultaria o objetivo principal que seria a monitorização da flutuação de patogenicidade. Neste contexto, surge a caracterização dos grupos filogenéticos, uma técnica bem mais simples, baseado em PCR (triplex - PCR), para identificação rápida dos grupos filogenéticos de *E. coli*. (CLERMONT; BONACORSI & BINGEN, 2000; ROCHA *et al.*, 2017).

Seguindo a linha de pesquisa desenvolvida no CDPA e sabendo da crescente preocupação em relação a resistência antimicrobiana em relação aos antimicrobianos de uso comum, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, o presente trabalho tem como objetivo realizar a caracterização de amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) utilizando grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana.

Todos esses trabalhos têm como finalidade a geração de critérios objetivos para a monitorização do status sanitário dos planteis avícolas, como também, para prever os dados de produção. A utilização destas ferramentas servirão como um aliado contra a subjetividade e a corrupção, conferindo à cadeia de produção avícola mais confiabilidade e seriedade.

4 ESTRUTURA DA TESE

Este documento está dividido em duas partes:

1. A apresentação geral do panorama da avicultura frente aos numerosos estudos realizados sobre a colibacilose, preocupações e possíveis soluções, quando há a implantação de novas ferramentas, no caso da utilização de grupos filogenéticos, e a resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC), frente aos antimicrobianos de uso comum na Medicina Veterinária e na Medicina Humana.
2. Trabalhos publicados que se relacionam a linha de pesquisa desenvolvida apresentados ao final como anexo:

Artigo 1

“Classification of antimicrobial resistance using artificial neural networks and the relationship of 38 genes associated with the virulence of *Escherichia coli* isolates from broilers.”

Artigo 2

“Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade in vivo.”

Experimento

“Caracterização as amostras de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) utilizando grupos filogenéticos e resistência antimicrobiana.”

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras

No presente estudo utilizou-se um total de 237 amostras de *Escherichia coli* de origem aviária (APEC) e 211 de origem humana (UPEC).

As amostras APEC foram isoladas entre 2002 e 2008 a partir de lesões de celulite, quadros respiratórios e de camas de aviários e encontravam-se preservadas em meio de cultura de caldo cérebro e coração (BHI) com glicerol em proporção 4:1 à temperatura de

-80°C. Essas amostras foram classificadas pelo índice de patogenicidade (SOUZA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016).

As cepas UPEC foram cedidas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e são provenientes de pacientes que estavam internados ou receberam atendimento ambulatorial e apresentavam infecção urinária causada por *E. coli*. Estas amostras foram coletadas entre os anos de 2012 a 2014 e encontravam-se preservadas em meio de cultura BHI com glicerol em proporção 4:1 à temperatura de -80°C. Todas as amostras pertencem à bacterioteca do CDPA.

As informações sobre as amostras APEC e UPEC utilizadas para a confecção deste estudo seguem citadas abaixo:

- Resistência antimicrobiana a 5 antibióticos de uso comum, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (amicacina, ampicilina, gentamicina, norfloxacin e cefuroxima).
- Classificação nos grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D).

5.2 Teste de sensibilidade antimicrobiana

As amostras APEC foram inoculadas em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Depois foram incubadas à 37°C por 24 horas e, feito isso, os inóculos foram plaqueados em *Eosine Metilene Blue* (EMB) e reincubados à 37°C por mais 24 horas (SALLE, 2009).

Posteriormente, foram selecionadas algumas colônias isoladas e repassadas a um tubo com 5mL de solução salina 1%, a fim de atingir a concentração de 0,5 na escala McFarland.

Com essa concentração estimou-se que existiam de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Conferida essa concentração, procedeu-se a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos. Com o auxílio de uma pipeta, adicionou-se 100mL do inóculo em placas que continham o meio de cultura Müller-Hinton e esse conteúdo foi

espalhado de forma uniforme com uma alça de Drigalsky previamente esterilizada. Esse procedimento foi realizado com todas as amostras em duplicata. A cepa de referência *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle da qualidade dos testes realizados.

O próximo passo foi a colocação dos discos antimicrobianos na superfície das placas de Ágar Müller- Hinton (que já continham as amostras semeadas) com a ajuda de uma pinça estéril. As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas. Para a realização dos testes foram utilizados 14 distintos antimicrobianos: amicacina, amoxicilina/ácido clavulâmico, ampicilina, cefalexina, cefuroxina, ceftiofur, ciprofloxacina, clindamicina, cotrimoxazol, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina, ofloxacina, e tetraciclina. Porém, destes, somente os resultados de sensibilidade de 5 antimicrobianos (amicacina, ampicilina, gentamicina e norfloxacina) foram utilizados para a análise no presente estudo.

Em relação às amostras de *E. coli* uropatogênicas (UPEC) cedidas pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre, também foi realizado o método de disco-difusão em ágar de acordo com a norma M2-A8 do CLSI (CLSI, 2003). Para a classificação da resistência antimicrobiana à ampicilina e norfloxacina todas as amostras foram aproveitadas devido os registros originais referentes a estes antimicrobianos, terem sido devidamente identificados e armazenados. No entanto, quando analisou-se a resistência à gentamicina e à amicacina, aproveitou-se somente 193 e 210 amostras respectivamente para cada antimicrobiano devido aos dados incompletos que perderam-se ou não foram completamente anotados pelos setores que inicialmente realizaram tais exames.

5.3 Grupos filogenéticos

Para a classificação tanto das amostras APEC quanto das UPEC nos grupos filogenéticos foi utilizada a metodologia desenvolvida por Clermont e colaboradores (2000). Inicialmente Rocha e colaboradores (2017) realizaram a reativação e os testes preliminares de confirmação de pureza das cepas de acordo com Lee & Nolan (2008). Posteriormente foi realizada a extração do DNA e a técnica de multiplex-PCR para a classificação das cepas nos grupos filogenéticos.

5.3.1 Extração do DNA e classificação das cepas em grupos filogenéticos

A extração do DNA foi realizada através do método por calor. As cepas APEC e UPEC foram classificadas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D), seguindo a mesma linha de raciocínio desenvolvida por Clermont *et al.* (2000), o qual é baseado na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA TspE4C2, através da técnica de multiplex-PCR.

O mix de reação deste multiplex foi composto por 2,5 µL de solução tampão 10_x, 0,75 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (1,5 U), 2 µL de cada dNTP (2 mM), 2 µL de cada um dos *primers* (20 pmol) e 5 µL de DNA bacteriano, complementado com o volume adequado de água ultra pura necessário para completar um volume final de 25 µL.

As etapas das reações de amplificação foram realizadas em um termociclador *Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems*, sob as seguintes condições: desnaturação inicial durante 5 min a 94 °C, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento a 55° C por 30 segundos, e uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C. Como controle positivo, foi utilizada a amostra de *E. coli* ATCC 25922. Na Tabela 1 estão descritos os primers utilizados e o tamanho de fragmentos gerados (Rocha *et.al.*, 2017).

Tabela 1- Sequência dos *primers*, tamanho de fragmentos de amplificação e referência bibliográfica dos genes pesquisados.

Gene	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referência dos primers
<i>chuA</i>	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Clermont <i>et. al.</i> , 2000
<i>yjaA</i>	F: TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG R: ATGGAGAATGCGTTCCTCAA	211	Clermont <i>et. al.</i> , 2000
<i>TspE4C2</i>	F: GAGTAATGTCGGGGCATTCA R: CGCGCCAACAAAGTATTACG	152	Clermont <i>et. al.</i> , 2000

A classificação dos isolados em relação ao grupo filogenético foi realizado da seguinte forma: as amostras pertencentes ao grupo A caracterizaram-se por apresentar: *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (-), as pertencentes ao grupo B1, *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e TSPE4.C2 (+). Foram classificadas no grupo B2: *chuA* (+), *yjaA* (+) e TSPE4.C2 (+/-). Já os isolados *chuA* (+), *yjaA* (-) e TSPE4.C2 (+/-) pertencem ao grupo D (Tabela 2).

Tabela 2 - Determinação dos grupos filogenéticos através da identificação dos genes pesquisados.

Gene Grupo	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
Grupo A	Ausente (-)	Presente/Ausente (+/-)	Ausente (-)
Grupo B1	Ausente (-)	Presente/Ausente (+/-)	Presente (+)
Grupo B2	Presente (+)	Ausente (+)	Presente (+)
Grupo D	Presente (+)	Ausente (-)	Presente/Ausente (+/-)

5.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *JMP*[®] 9.0.1 (*SAS Institute Inc.*, 2010) e do *Microsoft Excel*[®], adotando-se como referencial o nível de significância de 5% e o nível de confiança de 95%.

Inicialmente, confeccionou-se uma tabela em formato *Excel*[®], com os dados referentes aos índices de patogenicidade, grupos filogenéticos, susceptibilidade antimicrobiana tanto das amostras de *E. coli* patogênica aviária como das amostras de *E. coli* uropatogênica.

O segundo passo teve como objetivo principal determinar se havia associação entre a variável susceptibilidade antimicrobiana e por conseguinte, o comportamento antimicrobiano dos seguintes fármacos: amicacina, gentamicina, norfloxacin e ampicilina, e a origem das amostras (APEC e UPEC). Também verificou-se a associação entre estes antimicrobianos e a classificação das amostras nos seus respectivos grupos filogenéticos. Para tais análises, foi utilizado o teste não paramétrico qui – quadrado (χ^2).

6 RESULTADOS

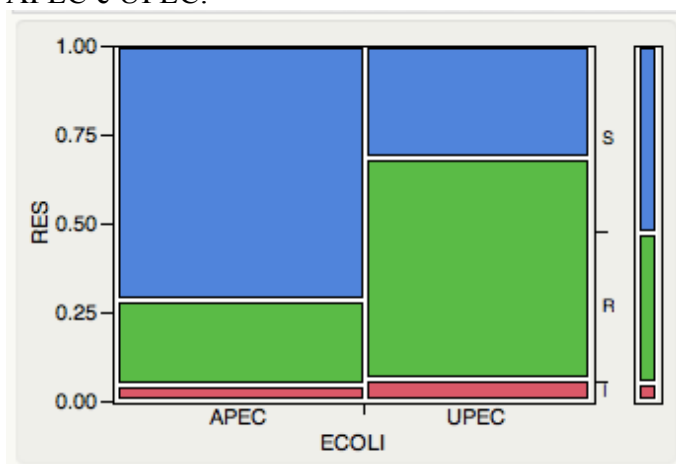
6.1 Perfil de sensibilidade antimicrobiana das amostras APEC e UPEC

No transcorrer desta tese analisou-se as informações referentes a cinco antimicrobianos que serão abordados a seguir.

6.1.1 Ampicilina

Após análise estatística entre as amostras de origem humana (211) e aviária (237), verificou-se uma diferença significativa entre a resistência antimicrobiana observada e a origem das amostras ($p < 0,0001$). Ou seja, as amostras UPEC têm mais do que o dobro da resistência apresentada pelas amostras APEC, 62,56% e 24,05%, respectivamente. Estes resultados estão descritos na figura 1 e tabela 3 que seguem abaixo:

Figura 1 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à ampicilina nas amostras APEC e UPEC.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam as proporções observadas das respectivas amostras : I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

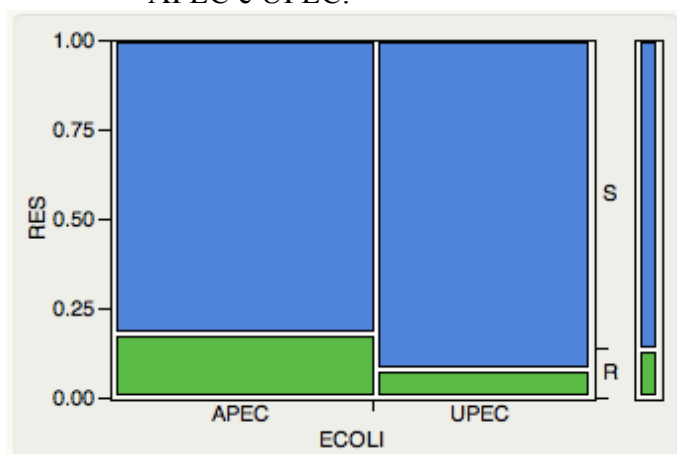
Tabela 3 – Frequência relativa (%) e absoluta da classificação da resistência bacteriana ao uso do antimicrobiano ampicilina nas cepas APEC e UPEC.

	Total (n=448)	Intermediário	Resistente	Sensível
APEC	237	4,64 (11)	24,05 (57)	71,31 (169)
UPEC	211	6,16 (13)	62,56 (132)	31,28 (66)

6.1.2 Gentamicina

Em relação ao antimicrobiano gentamicina, foram analisadas 193 amostras de origem humana (UPEC) e 237 aviárias (APEC), onde mais uma vez, demonstrou-se que existe uma relação significativa entre a resistência antimicrobiana e a origem das amostras ($p < 0,007$). Neste caso, a resistência das amostras APEC (17,72%) foi quase o dobro das amostras UPEC (8,29%). Estes resultados podem ser visualizados na figura 2 e tabela 4 abaixo.

Figura 2 –Frequência relativa (%) da classificação da resistência à gentamicina nas amostras APEC e UPEC.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções.
R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

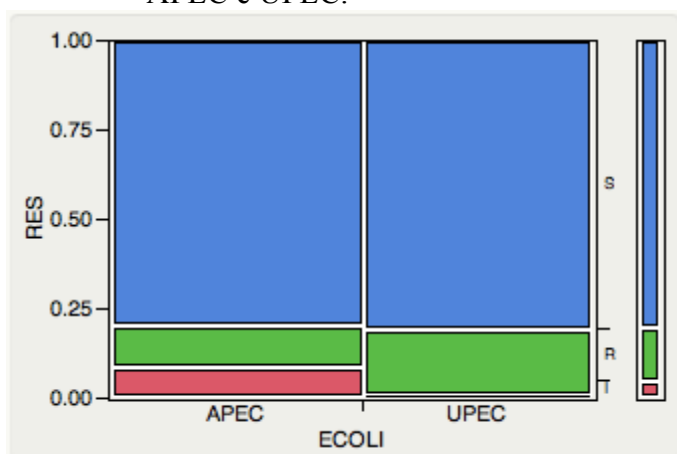
Tabela 4- Frequência relativa (%) e absoluta da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano gentamicina referente as cepas APEC e UPEC.

	Total (n=430)	Intermediário	Resistente	Sensível
APEC	237	0,42 (1)	17,72 (42)	81,86 (194)
UPEC	193	0 (0)	8,29 (16)	91,71 (177)

6.1.3 Norfloxacin

Nesta caso, analisando-se o comportamento antimicrobiano das 237 amostras APEC e 211 UPEC frente a este antimicrobiano, verificou-se que as amostras APEC diferiram em termos de resistência antimicrobiana das amostras UPEC ($p < 0,0001$). A figura 3 e a tabela 5 demonstram que a resistência antimicrobiana foi de 11,81% para as cepas APEC e de 11,81% para UPEC.

Figura 3 –Frequência relativa (%) da classificação da resistência à norfloxacin nas amostras APEC e UPEC.



Os valores do eixo vertical indicam proporções. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

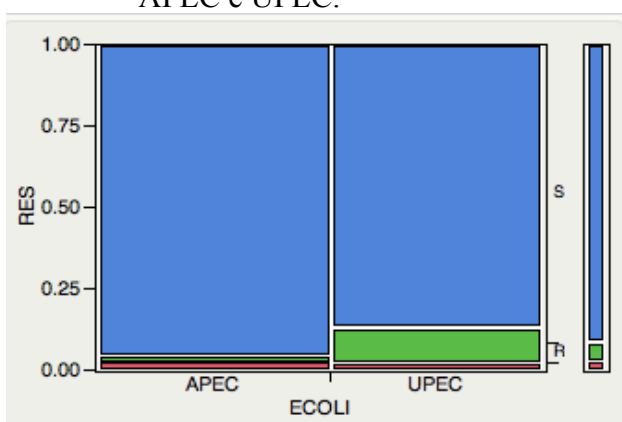
Tabela 5 - Frequência relativa (%) e absoluta da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano norfloxacin referente as cepas APEC e UPEC.

	Total (n=448)	Intermediário	Resistente	Sensível
APEC	237	8,44(28)	11,81 (28)	79,75 (189)
UPEC	211	0,95 (2)	18,01 (38)	81,04 (171)

6.1.4 Cefuroxima

A origem das amostras influenciou significativamente ($p < 0,001$) na resistência antimicrobiana à cefuroxima. Como pode ser visto na figura 4 e tabela 6, a resistência observada nas amostras APEC foi quase sete vezes menor (1,69%) do que nas amostras UPEC (11,37%)

Figura 4 – Frequência relativa (%) da classificação da resistência à cefuroxima nas amostras APEC e UPEC.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

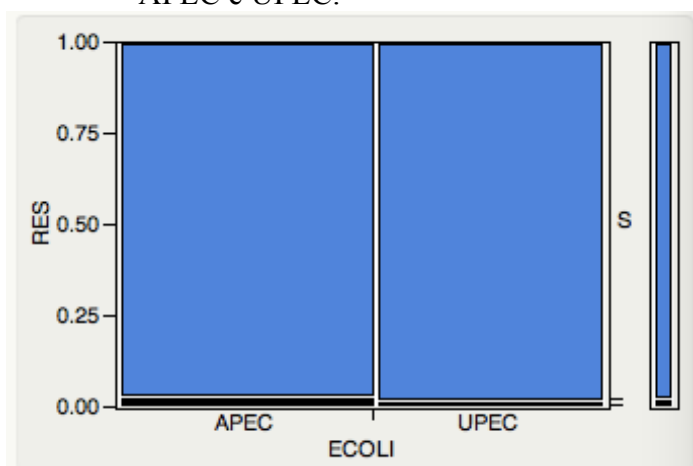
Tabela 6 – Frequência relativa (%) e absoluta da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano cefuroxima

	Total (n=448)	Intermediário	Resistente	Sensível
APEC	237	2,53(6)	1,69 (4)	95,78 (227)
UPEC	211	1,90 (4)	11,37 (24)	86,73 (183)

6.1.5 Amicacina

Nos testes de antibiograma realizados com 210 amostras UPEC e 237 amostras APEC, não foi encontrada diferença significativa entre a resistência antimicrobiana observada e a origem das amostras ($p > 0,14$). Evidenciando assim, que as amostras APEC comportam-se de forma similar às amostras UPEC quanto ao potencial de resistência. Estes resultados podem ser observados na figura 5 e tabela 7 a seguir.

Figura 5 –Frequência relativa (%) da classificação da resistência à amicacina nas amostras APEC e UPEC.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 7 – Frequência relativa (%) e absoluta da classificação da resistência bacteriana ao antimicrobiano amicacina

	Total (n=447)	Intermediário	Resistente	Sensível
APEC	237	1,27(3)	1,27 (3)	97,47 (231)
UPEC	210	0 (0)	1,43 (3)	98,57 (207)

6.2 Grupos filogenéticos e resistência antimicrobiana

As amostras APEC (237) e UPEC (211) foram classificadas em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) (ROCHA *et al.*, 2017). Esta informação foi utilizada para relacionar os grupos filogenéticos com a resistência antimicrobiana (Tabela 8). Na sequência serão apresentados a resistência antimicrobiana para cada um dos antimicrobianos estudados.

Tabela 8 – Frequência da susceptibilidade das amostras APEC e UPEC frente aos antimicrobianos estudados e sua classificação nos grupos filogenéticos.

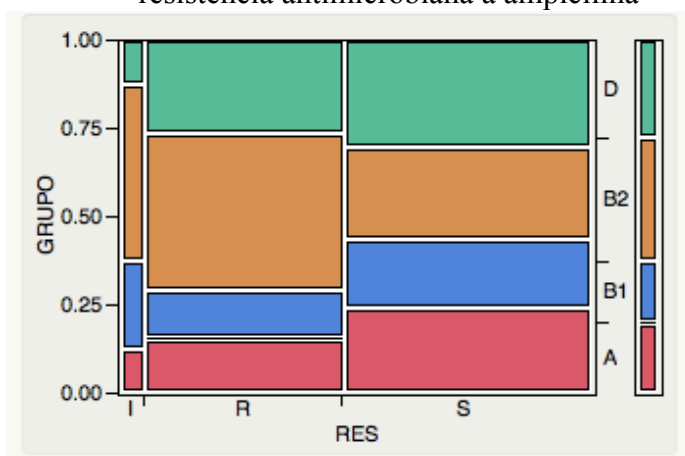
Grupo		A		B1		B2		D	
Tipo		APEC	UPEC	APEC	UPEC	APEC	UPEC	APEC	UPEC
Total (n.)		57	32	66	12	41	116	73	51
AMP	I	1	2	6	0	2	10	2	1
	R	11	18	18	8	12	72	16	34
	S	45	12	42	4	27	34	55	16
GEN	I	0	0	1	0	0	0	0	0
	R	9	1	11	0	7	9	15	6
	S	48	30	54	12	34	90	58	45
NOR	I	3	0	9	0	4	2	4	0
	R	4	8	10	7	4	11	10	12
	S	50	24	47	5	33	103	59	39
AMI	I	0	0	1	0	0	0	2	0
	R	0	0	1	0	0	3	2	3
	S	57	32	64	12	41	112	69	51
CEF	I	2	1	1	1	0	2	3	0
	R	1	6	3	1	0	9	0	8
	S	54	25	62	10	41	105	70	43

* Em relação a gentamicina foram analisadas 193 amostras UPEC e para amicacina 210 amostras UPEC.

6.2.1 Ampicilina

Verificou-se uma relação significativa entre a resistência antimicrobiana observada e os grupos filogenéticos ($p < 0,0015$). Ou seja, existe uma diferença de resistência antimicrobiana entre os grupos filogenéticos. Estes resultados estão descritos na figura 6 e na tabela 9, em que se observa que o grupo B2 é aquele com os maiores percentuais de resistência.

Figura 6 –Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à ampicilina



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções e representam os grupos filogenéticos. I (amostra intermediária), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 9 – Associação dos grupos filogenéticos com a susceptibilidade antimicrobiana à ampicilina das amostras de *Escherichia coli*:

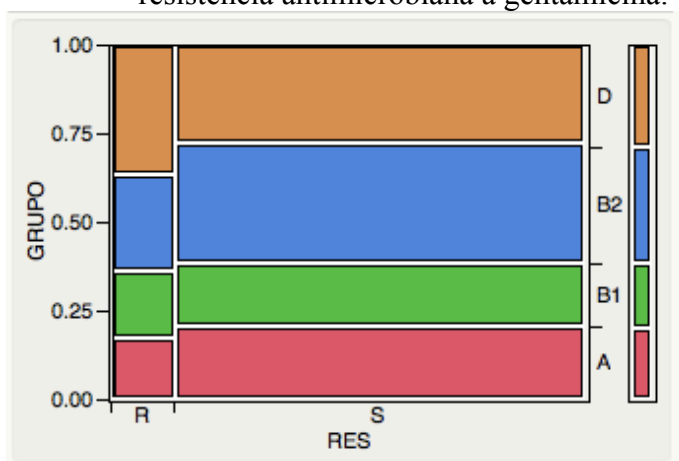
	A	B1	B2	D
Intermediário	12,50% (3)	25% (6)	50% (12)	12,5% (3)
Resistente	15,34% (29)	13,76% (26)	44,44% (84)	26,46% (50)
Sensível	24,26% (57)	19,57% (46)	25,96% (61)	30,21% (71)

* Os percentuais são calculados considerando o total das amostras por nível de resistência como 100%.

6.2.1 Gentamicina:

Não houve relação significativa ($p > 0,48$). Desta forma, no presente estudo, não existe uma diferença de resistência entre os grupos filogenéticos. O perfil de resistência antimicrobiana é semelhante em todos os grupos filogenéticos. Estes resultados estão demonstrados na figura 7 e na tabela 10 que seguem abaixo:

Figura 7 -Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à gentamicina.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções e representam os grupos filogenéticos. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 10 – Associação dos grupos filogenéticos com a susceptibilidade antimicrobiana à gentamicina das amostras de *Escherichia coli*

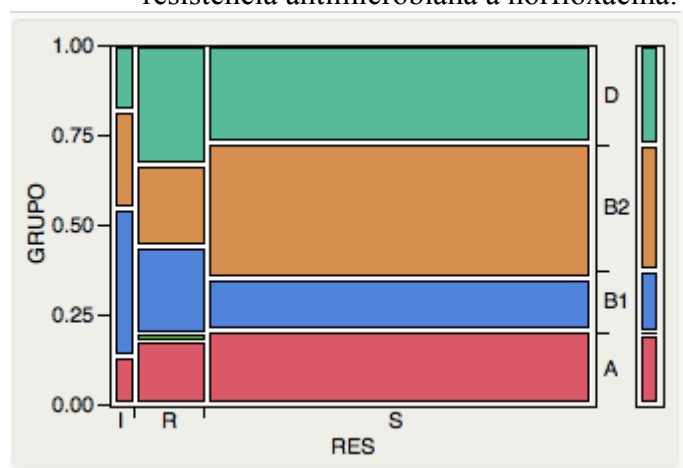
	A	B1	B2	D
Intermediário	0% (0)	100% (1)	0% (0)	0% (0)
Resistente	17,24% (10)	18,97% (11)	27,59% (16)	36,21% (21)
Sensível	21,02% (78)	17,79% (66)	33,42% (124)	27,76% (103)

* Os percentuais são calculados considerando o total das amostras por nível de resistência como 100%.

6.2.1 Norfloxacin:

Já em relação ao antimicrobiano norfloxacin, demonstrou-se que existe uma diferença significativa entre a resistência antimicrobiana e os grupos filogenéticos ($p < 0,0148$). As amostras do grupo D (33,33%) são as que apresentam a maior resistência. Estes dados encontram-se melhor ilustrados na figura 8 e na tabela 11 que seguem abaixo:

Figura 8 -Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à norfloxacin.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções e representam os grupos filogenéticos. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 11 – Associação dos grupos filogenéticos com a susceptibilidade antimicrobiana à norfloxacin das amostras de *Escherichia coli*

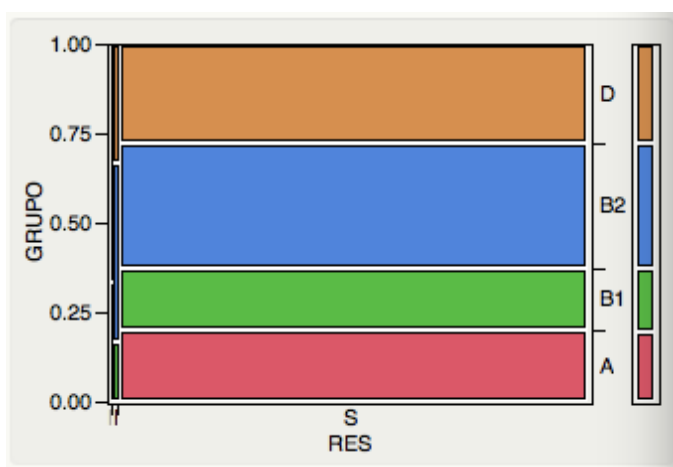
	A	B1	B2	D
Intermediário	13,64% (3)	40,91% (9)	27,27% (6)	18,18% (4)
Resistente	18,18% (12)	25,76% (17)	22,73% (15)	33,33% (22)
Sensível	20,56% (74)	14,44% (52)	37,78% (136)	27,22% (98)

* Os percentuais são calculados considerando o total das amostras por nível de resistência como 100%.

6.2.3 Amicacina

Na análise estatística do grupo filogenético em relação a classificação da resistência bacteriana a amicacina não houve diferença significativa ($p > 0,48$). Não existe uma relação entre grupo filogenético e a resistência antimicrobiana. Estes dados estão demonstrados na figura 9 e na tabela 12 que seguem abaixo:

Figura 9 -Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à amicacina.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções e representam os grupos filogenéticos. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 12 – Associação dos grupos filogenéticos com a susceptibilidade antimicrobiana à amicacina das amostras de *Escherichia coli*

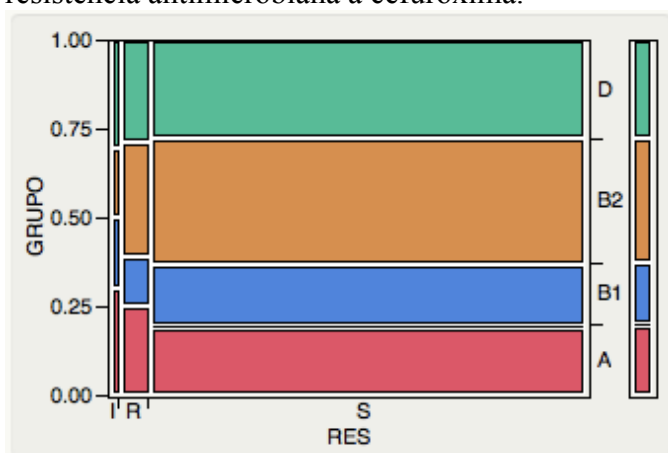
	A	B1	B2	D
Intermediário	0% (0)	33,33% (1)	0% (0)	66,67% (2)
Resistente	0% (0)	16,67%(1)	50% (3)	33,33% (2)
Sensível	20,32% (89)	17,35% (76)	34,93% (153)	27,40% (120)

* Os percentuais são calculados considerando o total das amostras por nível de resistência como 100%.

6.2.3 Cefuroxima

Não houve diferença significativa entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana ($p > 0,97$). Ou seja, o perfil de resistência antimicrobiana é semelhante em todos os grupos filogenéticos. Os resultados podem ser melhor observados na figura 10 e tabela 13 que seguem.

Figura 10 - Relação entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana à cefuroxima.



Legenda: Os valores do eixo vertical indicam proporções e representam os grupos filogenéticos. I (amostras intermediárias), R (amostras resistentes) e S (amostras sensíveis).

Tabela 13 – Associação dos grupos filogenéticos com a susceptibilidade antimicrobiana à cefuroxima das amostras de *Escherichia coli*

	A	B1	B2	D
Intermediário	30% (3)	20% (2)	20% (2)	30% (3)
Resistente	25% (7)	14,29%(4)	32,14% (9)	28,57% (8)
Sensível	19,27% (79)	17,56% (72)	35,61% (146)	27,56% (113)

* Os percentuais são calculados considerando o total das amostras por nível de resistência como 100%.

7 DISCUSSÃO

Ao longo do tempo, CDPA desenvolveu inúmeros experimentos e estudos que deram suporte a dissertações de mestrado e teses de doutorado. Essas pesquisas uniram algumas necessidades amplamente discutidas no mundo da avicultura, com ferramentas tecnológicas e métodos de tomadas de decisão. A modelagem matemática, a inteligência artificial, e a estatística propriamente dita, juntamente com uma correta escolha dos exames complementares, acabam dando um suporte para que a cadeia produtiva avícola torne-se ainda mais rentável, e monitorada através de critérios objetivos. Este trabalho tem como objetivo contribuir para criar um novo sistema de monitorização dentro da área de sanidade avícola.

No que diz respeito ao tema *Escherichia coli* APEC, os estudos iniciaram-se com a caracterização de genes associados à patogenicidade. No primeiro estudo identificou-se 7 genes associados à virulência (*papC*, *felA*, *cvaC*, *iutA*, *iss*, *tsh* e *kpsII*), a seguir pesquisou-se também o comportamento antimicrobiano frente a 14 fármacos utilizados na avicultura, e o bioquimismo das amostras, posteriormente foi estabelecido um índice de patogenicidade (ROCHA *et al.*, 2008; SALLE *et al.* 2010; FORTES, 2008; SOUZA *et al.*, 2016).

Com o aprimoramento dos protocolos de PCR foi desenvolvido um estudo com 38 genes de virulência, utilizando seis protocolos de multiplex - PCR. Seguindo os moldes da linha de pesquisa que une ferramentas inovadoras e o estabelecimento de critérios objetivos, pesquisou-se, por meio da inteligência artificial, a relação entre esses 38 genes de virulência e a resistência antimicrobiana (TEJKOWSKI, 2013; ROCHA *et al.*, 2015). Ao final deste estudo percebeu-se que a caracterização de 38 genes de virulência, por meio de 6 protocolos de multiplex-PCR, tornava-se inviável para realização de monitorizações rotineiras e constantes nos plantéis avícolas, pelo tempo requerido para a realização dos testes e pelo alto custo que isso viria a gerar.

Sabendo dessa dificuldade e também seguindo uma tendência relacionada a questões de bem-estar animal, desenvolveram-se estudos com base nos grupos filogenéticos, a partir da metodologia desenvolvida por Clermont e colaboradores (2000). Estes estudos classificaram as amostras em grupos filogenéticos A e B1 (cepas comensais, em sua maioria), B2 e D (cepas patogênicas), utilizando apenas um protocolo de multiplex-PCR, muito mais simples que os protocolos utilizados anteriormente, mais rápido e economicamente mais viável. Mais uma vez, com esse estudo que agregou a técnica de biologia molecular com a caracterização dos grupos filogenéticos, a inoculação de animais para determinar a patogenicidade daquelas cepas presentes no campo, pode ser evitada (ROCHA *et al.*, 2017). Estas pesquisas foram

desenvolvidas e aperfeiçoadas com a finalidade de auxiliar o médico veterinário, que está trabalhando no campo, a responder dois questionamentos bem simples, primeiro: “a bactéria é patogênica?” e segundo: “qual o tratamento?”.

Atualmente, os estudos envolvendo amostras APEC têm focado dois importantes temas: o potencial zoonótico dessas cepas, já que muitos isolados APEC são estreitamente relacionadas com ExPEC humanas (NMEC e UPEC), e o problema da multirresistência aos antimicrobianos. A resistência da *E. coli* APEC pode ser uma grande ameaça para a saúde pública, uma vez que os determinantes da resistência aos antimicrobianos podem ser transferidos para outras bactérias patogênicas, podendo desta forma comprometer o tratamento de infecções bacterianas graves (WANG *et al.* 2016).

Atentos a este panorama mundial, em 2009 foi realizada uma parceria com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), o qual cedeu cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas, isoladas de pacientes com infecções urinárias e seguindo as diretrizes do comitê de ética em pesquisa o referido projeto foi aprovado pelo órgão responsável (Anexo 1). Este material juntamente com as informações sobre o comportamento frente aos antimicrobianos foram tabelados. Assim sendo, elas foram classificadas dentro dos grupos filogenéticos. Além disto, estas cepas também passaram pelos protocolos de multiplex-PCR e os 38 genes associados aos fatores de virulência foram identificados, conforme apresentado no artigo 2.

Foram analisados os resultados de cinco antimicrobianos de uso comum na medicina veterinária e na humana. Amicacina, ao não relacionar a resistência antimicrobiana à origem das amostras, foi o único que atendeu a expectativa gerada pela literatura revelando o mesmo perfil de resistência tanto nas amostras APEC quanto nas UPEC. A maioria das amostras APEC (97,47%) e UPEC (98,57%) foram sensíveis para este antimicrobiano.

Estes resultados estão de acordo com outro estudo que também avaliou o perfil de resistência de 174 amostras APEC. Neste observou-se que todos os isolados foram susceptíveis a amicacina (MENDONÇA *et al.*, 2016). Em relação as cepas UPEC, informações semelhantes também foram descritas em outro trabalho que relata sensibilidade de 99,94% ao antimicrobiano amicacina (TERLIZZI; GRIBAUDO; MAFFEI, 2017).

Todos os demais antimicrobianos estudados no presente trabalho demonstraram que a origem da amostra relacionou-se significativamente com a resistência. Porém, somente na gentamicina as amostras APEC apresentaram um percentual de resistência superior às UPEC. Contrariando resultados do trabalho de Kazemini, Ahmadi & Dilmaghani (2014), no qual os isolados de cepas APEC (96%) foram mais sensíveis à gentamicina quando comparado com os isolados de UPEC. Todas as demais as amostras UPEC apresentaram uma resistência

claramente maior do que nas APEC. Ressalta-se que neste estudo as amostras não eram pareadas, ou seja, as amostras APEC não foram obtidas do alimento de origem avícola ingerido pelos pacientes.

Nos resultados do presente trabalho observou-se que dentre os cinco fármacos testados, três deles apresentaram maior resistência nas amostras UPEC que nas APEC. Esse dado acaba contrariando outros estudos encontrados na literatura, tal como: no estudo de Mellata (2013) quando relatou-se que o ambiente da produção avícola é um importante reservatório para a resistência antimicrobiana, e que esta simples presença bacteriana pode servir como agente primário tanto para a contaminação de produtos avícolas como acarretar um aumento no risco de transferência desses genes para humanos.

Em relação as análises realizadas entre os grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana observou-se que para a gentamicina, amicacina e cefuroxima não houve uma relação significativa, ou seja, a resistência se comportou de forma semelhante em todos os grupos filogenéticos. Da mesma forma, segundo Iranpour e colaboradores (2015), não foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos filogenéticos e a resistência à amicacina, à nitrofurantoína e ao meropeném. Por outro lado, os mesmos autores revelam que a maior prevalência a fármacos multirresistentes pertenciam ao grupo filogenético B2.

Já com respeito a ampicilina e a norfloxacinapela apesar de haver uma relação significativa a distribuição da resistência foi mais uniforme dentro dos grupos filogenéticos. Este estudo vem ao encontro de trabalho anterior, artigo 1, que relacionou o índice de patogenicidade com a resistência antimicrobiana das amostras APEC e no qual foi demonstrado que não há relação entre a patogenicidade bacteriana e a resistência antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 2015). Este assunto também foi abordado em um estudo que utilizou 228 estipes de *E. coli* isolados de origem humana, no qual verificou-se que tanto os isolados de infecções do trato urinário complicadas, como os de infecções do trato urinária não complicadas apresentaram um grau de patogenicidade semelhante (EUSÉBIO *et al.*, 2016). Estes trabalhos reforçam a necessidade da monitorização constante da patogenicidade da *Escherichia coli* APEC e UPEC e da resistência antimicrobiana, já que não há relação entre ambas.

8 CONCLUSÕES

1. Foi observada correlação entre a origem das amostras e a resistência antimicrobiana à ampicilina, gentamicina, norfloxacin e cefuroxima. Assim sendo, as amostras APEC diferem em termos de resistência antimicrobiana das amostras UPEC para estes fármacos.
2. Não houve diferença significativa entre a resistência antimicrobiana à amicacina e a origem das amostras. Evidenciando assim, que as amostras APEC se comportam de forma similar às amostras UPEC quanto ao potencial de resistência a este antimicrobiano.
4. No presente estudo, não houve uma relação entre grupo filogenético e a resistência antimicrobiana à amicacina, gentamicina e cefuroxima, ou seja, para estes antimicrobianos o perfil de resistência foi semelhante em todos os grupos filogenéticos. Porém, foi observada que existe uma diferença de resistência antimicrobiana à norfloxacin e a ampicilina entre os grupos filogenéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual, 2014. Disponível em: <ubabef.com.br>. Acesso em: 15 fev. 2015.

ABPA (Associação Brasileira de Proteína Animal). Relatório Anual, 2017. Disponível em: <ubabef.com.br>. Acesso em: 16 dez. 2017.

ANDREATTI FILHO, Raphael Lucio (Org). Colibacilose Aviária. In: **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Rocca, 2006.

BACK, Alberto. **Manual de doenças das aves**. Cascavel: Integração, 2010.

BARNES, H. J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J-P. Colibacillosis. In: **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ed. Calnek, B. D. Ames: University Press, 2008. p. 691-737. 1361p.

BARROS, M.R. *et al.* Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado do Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.5, p. 405-410. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000500008&script=sci_abstract&tlng=pt> . Acesso em: 11 dez. 2017.

BAUM, V, H & MARRE, R; **Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications**. *International Journal of Medical Microbiology*. v, 295 pg. 503-511. 2005.

BERGERON, C. R., *et al.* Chicken as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in humans, Canada. **Emerging Infectious Diseases**. v. 18, n. 3, p. 415-421. 2012.

CAMILOTTI, E. *et al.* Infectious Bursal Disease: Pathogenicity and Immunogenicity of Vaccines. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 18, n. 2. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2016000200303>. Acesso em: 16 dez. 2017.

CARVALHO, D. *et al.* Evaluation of thymic lymphocyte loss of broiler using Digital Analysis of the Lymphoid Depletion System (ADDL). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.36, p. 652-656. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016000700652> . Acesso em: 16 dez. 2017.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S. & BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of *Escherichia coli* Phylogenetic Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n. 10, p. 4555 – 4558. 2000.

CLERMONT, O. *et al.* The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v.5, n.1, p. 58-65. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23757131>> . Acesso em: 12 dez. 2017.

COSTA, da P.M. *et al.* Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. **Microb. Drug Resist.**, v. 14, n. 4, p. 299-306. 2008.

CUNHA, M.P.V. *et al.* Caracterização de APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) multivirulentas e multirresistentes. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n.12. 2015. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/28132/29567>> . Acesso em: 16 dez. 2017.

CUNHA, M.P.V. *et al.* A similaridade genética de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) com estirpes humanas e a resistência antimicrobiana justificam a preocupação sanitária em relação aos produtos de origem aviária? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.11, n.2, p. 24-33. 2013. Disponível em:< <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/16220>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

DALE, A.P. & WOODFORD, N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. **Journal of Infection**, v.71, p. 615-626. 2015. Disponível em: <[http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(15\)00287-X/fulltext](http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(15)00287-X/fulltext)>. Acesso em: 17 dez. 2017.

EWERS, C., *et al.* LI, G.; Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *int.j.med.microbiol.* v. 297, n. 3, p. 163-176. jun 2007.

EUSÉBIO, A. *et al.* *Escherichia coli* nas infecções urinárias da comunidade: commensal ou patogênica? **Acta Urológica Portuguesa**. v.33, n. 2, p. 37-42. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2341402216300015>> . Acesso em: 7 dez 2017.

FERREIRA, A. J. P. & KÖBIL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, Ângelo *et al.* **Doenças das Aves**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009.

FORTES, F.B.B. **Dissertação de mestrado**. Perfil bioquímico de 261 amostras de *Escherichia coli* isoladas de diferentes materiais de origem avícola no Estado do Rio Grande do Sul. 2008. UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias., 2008.

FURIAN, T.Q. *et al.* Use of Molecular Pathogenicity Indices to Identify Pathogenic Strains of *Pasteurella multocida*. **Avian Disease**, v.60, n.4, p. 792-798. 2016 Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/10.1637/11436-051116-Reg?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed> . Acesso em: 16 dez. 2017.

GIRARDINI, L.K. *et al.* Phylogenetic and pathotype analysis of *Escherichia coli* swine isolates from fouthern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.5, p. 374-378. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000500002>. Acesso em: 17 dez. 2017.

GYLES, C.L. Antimicrobial resistance in selected bactéria from poultry. **Anim Health Res. Rev.**, v. 9, n. 2, p. 149-158. 2008.

GREGERSEN, R.H. *et al.* Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. *Avian Pathology*, v. 39, n. 4. p. 287-295. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079457.2010.495744?scroll=top&needAccess=true>> . Acesso em: 4 dez. 2017.

GROSS, W.G. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In: ***Escherichia coli in domestic animals and humans***. Ed. Gyles, C. L. Guelph: Cab International, 1994. p. 237-259. 666p.

HUSSAIN, A. *et al.* Risk of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* from Commercial Broiler and Free-Range Retail Chicken in India. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02120/full>> . Acesso em: 14 dez. 2017.

IRANPOUR, D. *et al.* Phylogenetic groups of *Escherichia coli* strains from patients with urinary tract infection in Iran based on the new Clermont phylotyping method. **BioMed Research International**, v 2015. 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/846219/>>. Acesso em: 18 fev. 2017.

JAKOBSEN, L., *et al.* Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 31, n. 6, p. 1121-1129. 2012.

JOHNSON, T. J., *et al.* Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 9, n. 1, p. 37-46. 2012.

JOHNSON, J.R. & RUSSO T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 296, p. 383-404. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422105000998?via%3Dihub> .Acesso em: 16 dez. 2017.

KABIR, S.M.L. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **Int. Environ. Res. Health**. 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819778/pdf/ijerph-07-00089.pdf> >. Acesso em: 10 jan. 2012.

KANG, H.Y. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 55. p. 639-644. 2005.

KAZEMNIA, A.; AHMADI, M. & DILMAGHNI, M. Antibiotic resistance pattern of different *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Iranian Biomedical Journal**, v. 18, n.4, p. 219-224. 2014. Disponível em: < <http://ibj.pasteur.ac.ir/article-1-1166-en.pdf> > . Acesso em: 18 fev. 2018.

KÖHLER, C.D. & DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International Journal of Medical Microbiology**. v.301, p.642-647. 2011. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422111000920?via%3Dihub> >. Acesso em: 17 dez. 2017.

KOGA, V.L. *et al.* Evaluation of the antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from chicken carcasses in 2007 and 2013 from Paraná, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.12, n. 6. 2015. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2014.1888> >. Acesso em: 11 dez. 2017.

LIMA, D.A. *et al.* Establishment of a pathogenicity index in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains inoculated in one-day-old broiler chicks. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.68, n.2, p. 257-264. 2016. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352016000200257 > . Acesso em: 15 dez. 2017.

LYNNE, A.M. *et al.* Recombinant Iss as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 56, n.1, p. 192-199. 2012. Disponível em: <

http://www.bioone.org/doi/10.1637/9861-072111-Reg.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed& . Acesso em: 27 nov. 2017.

MADIGAN, M.T., *et al.* **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARKLAND, S.M. *et al.* Old friends in new places: exploring the role of extraintestinal *E. coli* in intestinal disease and foodborne illness. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n.7. 2015. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/zph.12194/abstract>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

MELLATA, M. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. **Foodborne pathogens and disease**, v. 10, n.11. 2013. Disponível em: < <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2013.1533>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

MENDONÇA, N. *et al.* Microarray evaluation of antimicrobial resistance and virulence of *Escherichia coli* isolates from Portuguese poultry. **Antibiotics**, v.5, n.4. 2016. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2079-6382/5/1/4>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

MITCHELL, N.M. *et al.* Zoonotic Potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.3. 2015. Disponível em:< <http://aem.asm.org/content/81/3/1177.long>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

MILES, T. D.; MCLAUGHLIN, W. & BROW, P. D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. **BMC Veterinary Research**, v. 2; n. 7. 2006. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395310/pdf/1746-6148-2-7.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

MCVEY, D.S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MORAES, H.L. *et al.* Infectious Bursal Disease : Evaluation of Maternal Immunity and Protection by Vaccination of One-Day Old Chicks Against Challenge with a Very Virulent Virus Isolate. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, n.1, p.51-57. 2005.

NAJAFI, A. *et al.* Distribution of pathogenicity island markers and virulence factors in new phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. **Folia Microbiol**, 2017. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12223-017-0570-3>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

NETO, J.P.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Rocca, 2005.

NORTON, R. A.; BILIGILI, S. F. & MCMURTREY, B. C. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. **Avian Diseases**. v. 41, n.2, p.422-428. 1997.

PILATTI, R.M. *et al.* Establishment of a Pathogenicity Index for One-dayold Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 18, n.2, p.255-260. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2016000200255>. Acesso em 15 dez. 2017.

PINTO, P.R. **Dissertação de Mestrado** Uso de redes neurais artificiais no gerenciamento de matadouros-frigoríficos de aves e suínos no sul do Brasil. 2006. - UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, BRRS, 2006.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Rio Grande do Sul: Artmed, p. 197-208, 2005.

REALI E.H. **Dissertação de Mestrado**. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento da produção de frangos de corte. 2004. - UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, BRRS, 2004.

REU, C.E. **Dissertação de Mestrado**. Incidência de bactérias causadoras de infecção urinária em pacientes atendidos pela unidade de saúde do município de Curitiba e análise genética de *Escherichia coli* uropatogênica. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Curitiba, 2013.

ROCHA, S.L.S *et al.* Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, 2017. Disponível em <<http://revistas.bvs-vet.org.br/actascivet/article/view/37522/42145>> . Acesso em: 15 dez. 2017.

ROCHA, S.L.S. **Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2017.

ROCHA, D. T. *et al.* "Classification of antimicrobial resistance using artificial neural networks and the relationship of 38 genes associated with the virulence of *Escherichia coli* isolates from broilers." **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n.2, p. 137-140. 2015. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100736X2015000200137&lng=pt&nrm=iso> . Acesso em: 16 dez. 2017.

SABATÉ, M.; MORENO, E.; PÉREZ, T.; ANDREU, A.; PRATS, G. "Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates." **Clinical Microbiology and Infection**, 880-886, 2006. Disponível em: <[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64306-8/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64306-8/pdf)> Aceso em: 15 dez. 2017.

SANTOS, A.C.M. *et al.*, A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400. 2009.

SALLE, C.T.P. *et al.* Correlation between aflatoxin and ocratoxin levels with production parameters in a poultry company. *In*: Fourth Asia – Pacific Poultry Health Conference, Melbourne, Australia. 1998.

SALLE, C.T.P. *et al.* Uso de Redes Neurais Artificiais para Estimar Parâmetros de Produção de Galinhas Reprodutoras Pesadas em Recria. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.3, p.257-264. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2001000300008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt> . Acesso em: 16 dez. 2017.

SALLE, C.T.P. *et al.* Use of artificial neural networks to estimate production variables of broilers breeders in the production phase. **British Poultry Science**, v.44, n.2. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12828206>>. Acesso em: 16 dez. 2017.

SALLE, F. O. **Dissertação de mestrado**. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) no gerenciamento do incubatório de uma empresa avícola do sul do Brasil. 2005. - UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2005.

SALLE, F. O. **Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

SALLE, F. O. *et al.* Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de

frangos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.38, n.1, p. 59-62. 2010. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/pdf/2890/289021810009.pdf>> Acesso em: 6 fev. 2018.

SARKAR, S. *et al.* Role of capsule and O antigen in the virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. **PloS ONE**, v. 9, n.4. 2014. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094786>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

SCOTT, M.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M.M. **Microbiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SOUZA, G. F. *et al.* Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, 2016. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/actascivet/article/view/30372/33104>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

SPOHR, A. **Dissertação de Mestrado**. Gerenciamento através de Redes Neurais Artificiais dos fenômenos que envolvem as atividades de produção de reprodutoras pesadas e do frango de corte, de um incubatório e de um abatedouro avícolas. 2011. - UFRGS-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, BRRS, 2011.

STROMBERG, Z.R. *et al.* Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. **PLOS ONE**, v.12, n.7. 2017. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0180599>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

TERLIZZI, M.E.; GRIBAUDO, G.;MAFFEI, M.E. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Frontiers in Microbiology**. v.8. 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01566/full>>. Acesso em: 7 dez.2017.

TIBA, M.R.; NOGUEIRA, G.P.;LEITE, D.S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.1, p. 58-62. 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v42n1/v42n1a12.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

TEJKWSKI, T.M. **Dissertação de mestrado**. Uso de redes neurais artificiais para classificação da patogenicidade de *Escherichia coli* de origem aviária. 2013. UFRGS -

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, 2013.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R. & CASE C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R. & CASE C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TOUCHON, M. *et al.* Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genetics**, v.5, n.1. 2009. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1000344&type=printable>>. Acesso em: 17 dez. 2017.

TRABULSI, L.R & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA, Relatório anual. **Ubabef**, São Paulo, 2012. Disponível em: <www.ubabef.com.br>. Acesso em: Abr. 2015.

VIEIRA, T. B. *et al.* Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Revista brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 13, n. 3, p. 174-177. 2006.



WANG, Y. *et al.* Isolation, phylogenetic group, drug resistance, biofilme formation, and adherence genes of *Escherichia coli* from poultry in central China. *Poultry Science*, v. 95, n. 12. Dez. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ps/article/95/12/2895/2656880>>. Acesso em: 01 fev. 2018.

ZHAO, L. *et al.* Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model. **Microbiology**, v. 155, n. pt 5, p. 1634-1644. 2009.

ANEXO 1

17/02/2018


Andamento do Projeto


Andamento do projeto - CAAE - 0215.0.001.000-10


Título do Projeto de Pesquisa
 Estabelecimento de uma nova análise de risco associando o uso da inteligência artificial (redes neurais artificiais) bacteriologia e técnicas de PCR (reação da cadeia de polimerase) para classificação, gerenciamento e predição de infecções urinárias em humanos

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	20/07/2010 16:46:56	11/01/2011 13:25:11		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	04/02/2010 15:47:25	Folha de Rosto	FR316551	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	20/07/2010 16:46:56	Folha de Rosto	0215.0.001.000-10	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	11/01/2011 13:25:11	Folha de Rosto	100315	CEP


Voltar

ARTIGO 1

Pesq. Vet. Bras. 35(2):137-140, fevereiro 2015

Classification of antimicrobial resistance using artificial neural networks and the relationship of 38 genes associated with the virulence of *Escherichia coli* isolates from broilers¹

Daniela T. Rocha², Felipe O. Salle², Gustavo Perdoncini², Silvio L.S. Rocha², Flávia B.B. Fortes², Hamilton L.S. Moraes², Vladimir P. Nascimento² and Carlos T.P. Salle^{2*}

ABSTRACT. Rocha D.T., Salle F.O., Perdoncini G., Rocha S.L.S., Fortes F.B.B., Moraes H.L.S., Nascimento V.P. & Salle C.T.P. 2015. Classification of antimicrobial resistance using artificial neural networks and the relationship of 38 genes associated with the virulence of *Escherichia coli* isolates from broilers. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(2):137-140. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: cdpa@ufrgs.br

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) is responsible for various pathological processes in birds and is considered as one of the principal causes of morbidity and mortality, associated with economic losses to the poultry industry. The objective of this study was to demonstrate that it is possible to predict antimicrobial resistance of 256 samples (APEC) using 38 different genes responsible for virulence factors, through a computer program of artificial neural networks (ANNs). A second target was to find the relationship between (PI) pathogenicity index and resistance to 14 antibiotics by statistical analysis. The results showed that the RNAs were able to make the correct classification of the behavior of APEC samples with a range from 74.22 to 98.44%, and make it possible to predict antimicrobial resistance. The statistical analysis to assess the relationship between the pathogenic index (PI) and resistance against 14 antibiotics showed that these variables are independent, i.e. peaks in PI can happen without changing the antimicrobial resistance, or the opposite, changing the antimicrobial resistance without a change in PI.

INDEX TERMS: *Escherichia coli*, artificial neural networks, antimicrobials agents, broilers.

RESUMO. [Utilização de redes neurais artificiais para a classificação da resistência a antimicrobianos e sua relação com a presença de 38 genes associados a virulência isolados de amostras de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte.] *Escherichia coli* patogênica (APEC) para as aves é responsável por vários processos patológicos em aves, sendo considerado como uma das principais causas de morbidade e mortalidade, associado com perdas econômicas para a indústria avícola. O objetivo do presente trabalho foi demonstrar que é possível prever a resistência antimicrobiana de 256 amostras de APEC uti-

lizando 38 genes responsáveis por distintos fatores de virulência, através de um programa computacional de redes neurais artificiais (RNAs). O segundo objetivo foi verificar por análise estatística a relação entre o índice de patogenicidade (IP) e a resistência aos 14 antimicrobianos. Os resultados demonstraram que as RNAs foram capazes de realizar a classificação correta do comportamento das amostras APEC com uma amplitude de 74,22 a 98,44%, desta forma tornando possível prever a resistência antimicrobiana. A análise estatística realizada para verificar a relação entre o IP e a resistência aos antimicrobianos demonstrou que estas variáveis são independentes, ou seja, podem haver picos no IP sem alteração na resistência, ou até mesmo o contrário, alteração na resistência antimicrobiana sem mudança no IP.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Escherichia coli*, redes neurais artificiais, agentes antimicrobianos, frangos.

¹ Received on August 29, 2014.

Accepted for publication on February 13, 2015.

² Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. *Corresponding author: cdpa@ufrgs.br

ARTIGO 2



Acta Scientiarum Veterinariae, 2017, 45: 1466.

RESEARCH ARTICLE
Pub. 1466

ISSN 1679-9216

Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*

Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and Human Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in Phylogenetic Groups and Association with Pathogenicity *In Vivo*

Silvio Luis da Silveira Rocha, Thales Quedi Furian, Karen Apellanis Borges, Daniela Tonini da Rocha,
Hamilton Luiz de Souza Moraes, Carlos Tadeu Pippi Salle & Vladimir Pinheiro do Nascimento

ABSTRACT

Background: Avian pathogenic *E. coli* (APEC) and uropathogenic *E. coli* (UPEC) are responsible, respectively, for avian colibacillosis and for 80% of urinary tract infections in humans. *E. coli* control is difficult due to the absence of a reliable method to differentiate pathogenic and commensal strains. Genetic similarity between APEC and UPEC suggests a common ancestral origin and the capability of potentially pathogenic strains to affect human health. The classification in phylogenetic groups facilitates the identification of pathogenic strains. The objective of this work was to classify APEC and UPEC *E. coli* strains into phylogenetic groups and to associate it with *in vivo* pathogenicity.

Materials, Methods & Results: 460 APEC and 450 UPEC strains, stored in BHI with glycerol at -80°C, were selected. APEC strains were isolated from cellulitis, respiratory tract and poultry litter of broiler flocks from Southern Brazil. The UPEC strains from urinary tract infection were provided by a hospital in Porto Alegre. After DNA extraction, APEC and UPEC strains were classified into four phylogenetic groups (A, B1, B2 and D) by a multiplex-PCR protocol for the detection of the *chuA* and *yjaA* genes and the TspE4.C2 DNA fragment. Phylogenetic groups were associated with pathogenicity indexes (PI), presented on a scale of 0 to 10, which were previously obtained through the inoculation of APEC strains in one-day-old chicks. Phylogenetic groups were also associated with the presence of 38 virulence-associated genes. The multiplex-PCR protocol was able to differentiate 100% of the APEC and UPEC strains in the four phylogenetic groups. The majority of APEC strains were classified into phylogenetic groups D (31.1%) and B2 (24.1%). On the other hand, the majority of UPEC strains were classified into B2 (53.6%). Among APEC strains, five genes (*crl*, *mat*, *ompA*, *fimC* and *fimH*) were detected in more than 80% of strains in all groups. Some genes showed a significant association with specific phylogenetic groups. Gene *ireA* was exclusively to group D, *kpsMT II* and *cvaC* to B2 and *sat* was exclusively to B1. Four genes (*ireA*, *sfa/focCD*, *ibeA*, *tsh*) were detected in more than 70% of UPEC strains in all phylogenetic groups. Gene *iroN1* showed a significant association exclusively to group A, and *iucD*, *papC* and *irp2* to B1 group. APEC isolated from poultry litter presented significantly lower PIs than those isolated from cellulitis and from birds with respiratory signs. The average PI from B2 group was significantly higher than that of D group. In addition, the PIs of the two groups were significantly higher than those of A and B1.

Discussion: The high frequency of UPEC classified as B2 is in agreement with the literature. More virulent strains are usually classified into B2 group and some of them may be classified into D group. On the other hand, the distribution of APEC isolates in phylogenetic groups is characterized by variability and it is usually related to the origin of the isolates, as observed in the study. Since *E. coli* strains isolated from human and poultry face similar challenges in infection establishment of extraintestinal sites, they may share some virulence genes. In this study, most of the 38 genes presented a high frequency in both APEC and UPEC strains. As the distribution of APEC strains in phylogenetic groups showed a significant association with pathogenicity, multiplex-PCR becomes an important tool for screening the pathogenicity of strains isolated from the poultry production chain.

Keywords: molecular characterization, colibacillosis, urinary tract, pathogenicity index.

Received: 24 February 2017

Accepted: 3 August 2017

Published: 18 August 2017

Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA), Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. CORRESPONDENCE: C.T.P. Salle [tadsalle@gmail.com - Fax: +55 (51) 3308-6138]. Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA), UFRGS. Av. Bento Gonçalves n. 8824. Bairro Agronomia. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.